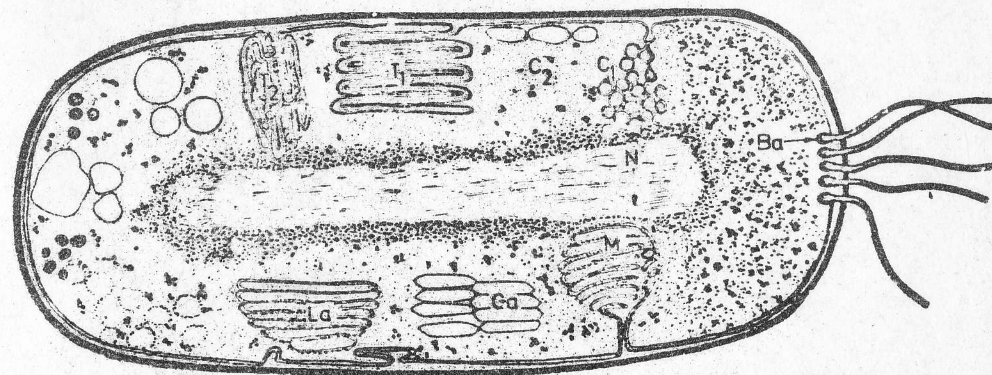
UNIVERSITATEA „AL. I. CUZA" IAŞI
FACULTATEA DE BIOLOGIE - GEOGRAFIE

N. D. Topală

Microbiologie generală



VOL. I

uz intern
1978

C U P R I N S

CUVINT INAINTE

Cînd m-am hotărît să scriu acest nou curs de microbiologie generală, mărturisesc că nu mi-a fost uşor să optez între structura clasică a cursurilor, manualelor sau tratatelor de microbiologie şi o structură care fără să omită problemele fundamentale ale acestei ştiinţe biologice de sinteză, să le prezinte într-o viziune nouă, mai apropiată profilului celor cărora li se adresează.

Am optat pentru cea de a doua alternativă, mai dificilă dar, după părerea noastră, în concordanţă cu exigenţele biologiei moderne. Opţiunea mi-a fost facilitată de experienţa acumulată şi de faptul că am beneficiat de o bogată literatură de specialitate, publicată în ultimii ani, care mi-a permis să revizuiesc, pe baza noilor cercetări electronomicroscopice, de biologie moleculară, de fiziologie celulară şi biochimie, multe dintre aspectele privind structura, funcţiile, genetica şi ecologia microorganismelor.

Intenţia mi-a fost să scriu o biologie a microorganismelor utilizînd ultimele cercetări din acest vast şi complex domeniu, iar dacă am reuşit voi fi satisfăcut că am făcut o muncă utilă pregătirii viitorilor biologi. De altfel, consider că cei mai intransigenţi critici sînt chiar beneficiarii cursului. Experimentarea acestui nou mod de a concepe şi preda microbiologia generală în anul universitar 1976-1977 s-a încheiat, apreciind după rezultatele obţinute de studenţi, cu succes. Incurajat de aceasta m-am hotărît să multiplic cursul şi să-l pun la dispoziţia studenţilor biologi de la cursurile de zi şi fără frecvenţă.

Sînt convins că iconografia cursului este deficitară, dar am ales numai acele figuri şi scheme care să poată fi xerografiate cu claritate. De asemenea, lipsa unui glosar poate fi resimţită în special de studenţii de la cursurile fără frecvenţă. Am încercat însă, pe cît mi-a fost posibil, să explic aproape toţi termenii în text.

Menţionez că problemele de microbiologie industrială

nu sînt cuprinse în acest curs. Acestea fac obiectul unei alte lucrări în curs de elaborare.

Doresc să exprim gratitudinea mea prof.dr.doc.Grigore Teodorovici, conf.dr.Natalia Stavri de la I.M.F. Iaşi şi conf.dr.Vlad Artenie pentru că au avut răbdarea să citească cursul, pentrusugestiile făcute cu ocazia analizei şi pentru aprecierile generale favorabile. De asemenea, mulţumesc călduros studenţilor Filomela Ouatu şi Constantin Manolache, membri ai cercului ştiinţific de microbiologie generală, pentru traducerea unor texte din limba germană şi executarea celor mai multe dintre figuri.

In sfîrşit, voi fi recunoscător tuturor celor care, cu bună credinţă, îmi vor sesiza lipsurile cursului sau îmi vor face sugestii de îmbunătăţire.

Iaşi, mai 1977 Autorul

INTRODUCERE SI ISTORIC .

Microbiologia este ştiinţa care se ocupă cu studiul organismelor mici, invizibile cu ochiul liber, cu o structură simplă, în general unicelulare sau pluricelurare dar lipsite de diferenţieri tisulare, numite microorganisme.

Microorganismele, sau protistele (Haekel 1866) reprezintă un grup heterogen, cu o morfologie foarte variată şi activitate chimică caracteristică dar cu poziţie sistematică diferită.

In stadiul actual de dezvoltare al ştiinţelor biologice, microbiologia se ocupă cu studiul: virusurilor, bacteriilor, ciupercilor microscopice (levuri şi mucegaiuri), algelor unicelulare şi protozoarelor. Virusurile, cu toate că, sînt fundamental deosebite de protistele propriu zise, fac totuşi obiectul de studiu al microbiologiei, iar algele şi protozoarele deşi protiste mai fac, prin tradiţie, obiectul de studiu al botanicei şi zoologiei.

Microbiologia generală este o ştiinţă biologică fundamentală. Ea studiază caracterele generale ale microorganismelor, morfologia, structura, fiziologia, genetica şi ecologia lor. Este deci o ştiinţă de sinteză şi are strînse legături cu biochimia, fiziologia, genetica, ecologia şi biologia generală.

Deşi microbiologia este o ştiinţă biologică relativ tînără, datorită heterogenităţii microorganismelor şi a uriaşei activităţi pe care acestea o desfăşoară în natură, s-au diferenţiat în cadrul ei, mai cu seamă în secolul nostru, o serie de discipline microbiologice independente. Acestea pot fi grupate după mai multe criterii:

I. După grupul taxonomic studiat:

1.Virologia.
2.Bacteriologia.
3.Micologia.

4.Algologia(Ficologia).
5.Protozoologia.

II.După activitatea microorganismelor în raport cu mediul în care trăiesc:

1.Microbiologia acvatică(Hidromicrobiologia).
2.Microbiologia solului.

III.După natura problemelor studiate:

1.Fiziologia microorganismelor.
2.Ecologia microorganismelor.
3.Genetica microorganismelor.

IV.După aplicaţiile practice:

1.Microbiologie medicală(umană şi veterinară).
2.Microbiologie industrială.
3.Microbiologie geologică(Geomicrobiologie).
4.Microbiologia insectelor.
5.Microbiologie agricolă.

In sfîrşit cea mai tînără disciplină microbiologică este Microbiologia cosmică care studiază influenţa spaţiului cosmic asupra viabilităţii, variabilităţii şi eredităţii microorganismelor precum şi problema existenţei microorganismelor pe alte planete.

x
x x

Microbiologia apare ca ştiinţă abia în a doua jumătate a secolului XVII, după ce a fost descoperit microscopul. Existenţa microorganismelor ca agenţi etiologici ai unor boli era însă bănuită din antichitate. THUCIDIDE (sec.IV î.e.n.) pomeneşte de existenţa unui "contagium vivum animatum", MARCUS TERENTIUS VARO de "animalia minuta" iar LUCRETIUS în DE RERUM NATURA scrie despre "sămînţa" sau "germenii bolilor".

In Evul Mediu, HYERONYMUS FRACASTORIUS (1483-1553) în cartea sa "De contagionibus, de morbis contagiosis et eorum curatione" arăta că bolile infecţioase se transmit printr-un organism viu, invizibil, "contagium vivum".

Existenţa acestor organisme invizibile, deşi presupusă, nu a putut fi dovedită decît în a doua jumătate a sec.XVII cînd olandezul ANTONY VAN LEEUWENHOEK (1632-1723), cu ajutorul unui microscop construit de el şi care mărea de 300 ori, observă protozoare, alge,nematode, rotifere şi bacterii. El descrie şi desenează aceste organisme, necunoscute pînă atunci, în lucrarea sa "Arcana naturae ope microscopiorum detecta" (1675). Observaţiile şi descrierile lui Leeuwenhoek constituie începuturile microbiologiei ca ştiinţă.

In sec.XVIII existenţa protozoarelor a fost confirmată de LOUIS JOBLOT (1645-1723) iar cea a bacteriilor de OTTO F. MÜLLER. La începutul sec.XIX CHRISTIAN GODFRIED EHRENBERG în lucrarea "Infuzoriile ca organisme complexe" (1838) include printre acestea şi trei familii de bacterii. Unele denumiri de genuri bacteriene date de Müller şi Ehrenberg s-au păstrat în sistematica bacteriană pînă astăzi. In aceeaşi perioadă inginerul francez CHARLES GAGNIARD LATOUR (1777-1859) descrie(1836) levurile din bere şi din mustul care fermentează. Independent şi aproape simultan, în Germania, Th.SCHWANN şi FRIEDERICH KÜTZING fac observaţii asemănătoare afirmînd că levurile sînt agenţii fermentaţiei alcoolice.

In a doua jumătate a sec.XIX, progresele chimiei şi fiziologiei anunţate prin descoperirile asupra fermentaţiilor, pe de o parte, reactualizarea vechii teorii a generaţiei spontane şi teoria microbiană a bolilor infecţioase, pe de altă parte, au constituit cei trei factori care au determinat dezvoltarea microbiologiei ştiinţifice. Acest eveniment ale cărui repercusiuni au fost imense, atît în biologie cît şi în medicină şi industrie a fost declanşat şi dominat de geniul lui LOUIS PASTEUR (1822-1895).

L.PASTEUR, chimist, îşi începe activitatea ştiinţifică în domeniul cristalografiei. Cercetările sale asupra asimetriei moleculare l-au îndreptat spre studiul fermentaţiei lactice deoarece acidul lactic, produsul final al acestei fermentaţii este un compus optic activ. Cercetările lui ulterioare sînt îndreptate asupra naturii fermentaţiilor, problemă atunci deosebit de controversată,mai ales datorită vehemenţei cu care

BERZELIUS, LIEBIG şi WÖHLER susţineau că fermentaţiile sînt fenomene pur chimice, spre deosebire de LATOUR, SCHWANN şi KÜTZING care le considerau produse de organisme vii. Timp de 2o ani (1857-1877) PASTEUR studiază o serie de fermentaţii (lactică, alcoolică, acetică, butirică) şi ajunge la unele concluzii de o importanţă fundamentală. PASTEUR arăta că:

-fermentaţiile sînt procese biologice produse de organisme vii anaerobe; (fermentaţia este viaţa fără aer);

-intervenţia unui microorganism străin deviază cursul normal al fermentaţiei determinînd "o boală a fermentaţiei";

-microorganismele străine, contaminante, pot fi distruse prin căldură.

Plecînd de la aceste concluzii iniţiale, PASTEUR extinde noţiunea de specificitate a acţiunii biologice şi la bolile omului şi animalelor, în sensul că după cum fiecare fermentaţie este rezultatul activităţii unui anumit microorganism, tot aşa şi fiecare boală infecţioasă este produsă de un microorganism specific. In felul acesta PASTEUR elaborează teoria microbiană a bolilor infecţioase care a stimulat numeroase cercetări în vederea identificării etiologiei infecţiilor umane şi animale soldate cu descoperirea unui număr din ce în ce mai mare de agenţi patogeni. Pasteur reuşeşte să studieze proprietăţile şi activitatea microorganismelor izolate în culturi pure şi încearcă metode de atenuare a virulenţei lor. Astfel studiind holera găinilor el dovedeşte că agentul patogen îşi pierde virulenţa prin învechire devenind incapabil de a mai produce boala. Inoculînd păsări cu astfel de culturi învechite, constată nu numai că ele nu se îmbolnăvesc ci din contra devin imune faţă de o nouă inoculare cu o cultură foarte virulentă. Rezultatele acestor cercetări îl constituie prepararea vaccinului antimicrobian, punerea bazelor vaccinării şi descoperirea imunităţii. Vaccinul antiholeric aviar a fost primul vaccin descoperit de PASTEUR. Ulterior, prepararea vaccinului anticărbunos (1881) şi a vaccinului antirabic(1885) au constituit cele mai mari descoperiri ale lui PASTEUR, care l-au consacrat nu numai ca părinte al microbiologiei ştiinţifice dar şi ca un mare binefăcător al omenirii.

Lucrările lui PASTEUR asupra fermentaţiilor au determinat şi reactualizarea vechei controverse asupra teoriei generaţiei spontane.

Teoria genezei spontane a organismelor din materia lipsită de viaţă îşi are originea în antichitate, dar în sec. XVII FRANCESCO REDI (1626-1697) demonstrează experimental nevaliditatea ei. Descoperirea microorganismelor determină însă reluarea problemei genezei spontane într-o variantă nouă. Astfel marele naturalist francez G.BUFFON şi abatele irlandez J.C.NEEDAM susţineau că microorganismele provin din transformarea substanţelor organice inerte, preexistente. Această variantă, cunoscută sub denumirea de teoria heterogeniei, va provoca aprinse controverse în sec.XIX, cînd ea este susţinută cu tărie de POUCHET, JOLLY şi MUSSET în Franţa şi de HENRI CHARLTON BASTIAN în Anglia, care nu ţineau seamă de demonstraţiile experimentale ale lui LAZZARO SPALANZANI din sec. XVIII. PASTEUR se angajează în această polemică demonstrînd ingenios şi magistral, fară putinţă de tăgadă, ca microorganismele nu se nasc în mod spontan cu toate că ele se găsesc peste tot în natură. Intr-un lichid, oricît de favorabil ar fi el multiplicării microorganismelor (bulion de carne) acestea nu apar spontan. Un astfel de lichid nutritiv încalzit un anumit timp la 120°C şi ferit apoi de orice contact cu mediul extern (baloane cu gît de lebădă) rămîn sterile oricît le-am conserva. Aceste cercetări ale lui PASTEUR, concepute genial, au infirmat definitiv vechea teorie a genezei spontane. Importanţa lor este atît de mare încît au fost comparate de OPARIN cu revoluţia înfăptuită în astronomie de COPERNIC.

O altă personalitate proeminentă în microbiologie a fost ROBERT KOCH (1843-191o), care alături de PASTEUR sînt consideraţi fondatorii microbiologiei ştiinţifice. Importanţa lucrărilor lui PASTEUR şi KOCH este considerabilă nu numai prin aspectul lor pur ştiinţific ci şi prin latura lor practică. Lucrările acestor doi iluştri savanţi au fundamentat din punct de vedere ştiinţific lupta împotriva infecţiilor microbiene.

ROBERT KOCH - medic german - introduce în tehnica bacteriologică mediile de cultură solide şi noi tehnici de colorație. Descoperă mai mulţi agenţi patogeni printre care şi vibrionul holeric, agentul etiologic al holerei asiatice. Ceea ce l-a consacrat însă pe KOCH a fost descoperirea bacilului tuberculozei, studiul acestui bacil şi a bolii produsă de el. El formulează şi postulatele după care se poate demonstra că un agent patogen este factorul determinant al unei boli, cunoscute sub numele de postulatele lui KOCH. Unele îşi păstrează valabilitatea şi astăzi, cel puţin într-un număr însemnat de cazuri. Acestea prevăd ca:

a) microorganismul să poată fi pus în evidenţă întotdeauna în leziunile care i se atribuie;

b) să poată fi obţinut în cultură pură şi cultivat pe medii artificiale;

c) cultura pură inoculată la un animal receptiv să producă leziuni specifice din care agentul patogen să poată fi reizolat.

Dacă cercetările şcolii create de R.KOCH s-au soldat cu descoperirea agenţilor principalelor boli infecţioase, lucrările şcolii pasteuriene asupra vaccinurilor puneau bazele unei noi ştiinţe, imunulogia, care apoi cunoaşte o dezvoltare rapidă. Astfel, în 1882, ILIA MECINIKOV (1845-1916)-biolog rus, descoperă fagocitoza şi pune bazele imunulogiei celulare. Pentru MECINIKOV fagocitoza era mecanismul principal, dacă nu chiar unicul, al imunităţii naturale şi al imunităţii dobîndite. Ulterior însă, descoperirea seroterapiei de către BEHRING şi KITASATO avea să dovedească că, pe lîngă imunitatea celulară organismele posedă, pentru lupta împotriva agresiunilor bacteriene, alte mecanisme de apărare, mai eficiente, mecanismele imunităţii umorale.

Importante contribuţiuni la dezvoltarea imunulogiei aduc ROUX şi YERSIN, elevi ai lui PASTEUR, care în 1889 descoperă toxina difterică. In acelaşi an HANS BÜCNER descoperă alexina sau complementul, factor umoral al imunităţii nespecifice, iar PFEIFFER între 1893 şi 1895 descoperă fenomenul de liză bacteriană sau bacterioliza.

In 1895, cu ocazia morţii lui PASTEUR, JULES BORDET publică un articol care precizează, pentru prima dată, noţiunile de ser imun, antigen şi anticorp, pînă atunci confuze. Tot BORDET explică mecanismul de acţiune al alexinei(1898) şi mecanismul reacţiei de fixare a complementului, în colaborare cu GEANGOU, iar împreună cu WASSERMAN (1906) aplică această reacţie la diagnosticul sifilisului.

GRUBER şi DÜRHAM (1896) descoperă anticorpii numiţi aglutinine şi reacţia de aglutinare, iar un an mai tîrziu KRAUS descrie precipitarea toxinelor de către antitoxinele din serul imun corespunzător.

Un rol deosebit în dezvoltarea imunulogiei l-a avut PAUL EHRLICH care a lărgit considerabil cîmpul imunităţii umorale şi tot el a pus bazele chimioterapiei.

Sfîrşitul sec.XIX este marcat şi de alte descoperiri epocale în microbiologie. Este vorba de descoperirea virusului mozaicului tutunului de către D.IVANOVSKI (1892) şi confirmarea acestei descoperiri în 1898 de BEIJERINCK.Tot atunci SERGHEI WINOGRADSKI şi MARTINUS BEIJERINCK prin lucrările lor pun bazele microbiologiei solului.

Numeroase descoperiri, de o importanţă fundamentală ştiinţifică şi practică, au fost realizate în secolul nostru. Astfel în 1911 americanul ROUS descoperă primul virus oncogen, iar TWORT (1915) şi D'HÉRELLE (1917) descriu fenomenul bacteriofagie şi descoperă bacteriofagul. In 1929, ALEXANDER FLEMING (1881-1955) prin descoperirea penicilinei deschide era antibioticelor. Izolarea şi purificarea penicilinei este realizată 11 ani mai tîrziu (1940)de FLOREY şi CHAIN. S.A. WAKSMAN descoperă în 1944 streptomicina, antibiotic produs de un actinomicet şi amorsează cercetările care aveau să izoleze şi să identifice un mare număr de tulpini de microorganisme producătoare de antibiotice. In sfîrşit, descoperirea mecanismelor de transfer genetic la bacterii şi al celui de recombinare genetică au dus la crearea geneticii moleculare (AVERY 1944) şi au adus, alături de biologia moleculară, numeroase date pentru explicarea proceselor esenţiale ale vieţii.

Contribuţia românească la dezvoltarea microbiologiei

Fondatorul microbiologiei româneşti a fost VICTOR BABEŞ (1854-1926).Savant de talie mondială,VICTOR BABEŞ a desfăşurat o activitate ştiinţifică prodigioasă concretizată în peste o mie de lucrări ştiinţifice. El studiază structura bacteriilor şi pune în evidenţă, la bacilul difteric, prezenţa unor granulaţii metacromatice, numite de atunci granulaţiile BABEŞ--ERNST. A făcut cercetări asupra leprei, tuberculozei, pneumoniei. A pus în evidenţă agentul etiologic al hemoglobinuriei bovinelor numit apoi Babesiella bovis. Impreună cu profesorul francez V.CORNIL, a publicat, în limba franceză,primul tratat de bacteriologie din lume: "Bacteriile şi rolul lor în anatomia şi histologia patologică" (1885). In această carte se face o primă încercare de sistematizare a cunoştinţelor despre microorganisme, prima trecere în revistă a metodelor de lucru în bacteriologie. In capitolele ei se găsesc idei uimitor de avansate pentru acea vreme, adevărate previziuni ştiinţifice. După PASTEUR, este primul mare microbilog care a sesizat semnificaţia antagonismului microbian şi importanţa antibioticelor în terapeutica bolilor infecţioase. Ca şi PASTEUR, preocupat de problema rabiei, BABEŞ descoperă în neuronii animalelor moarte de turbare corpusculi caracteristici,cu valoare de diagnostic, numiţi corpusculii BABEŞ-NEGRI. El prepară, după o metodă proprie vaccinul antirabic şi introduce vaccinarea antirabică în ţara noastră. In anul 1889, cu puţin înaintea descoperirii seroterapiei, BABEŞ constată că serul animalelor injectate, în repetate rînduri, cu ţesut rabic virulent capătă proprietăţi preventive.

Activitatea ştiinţifică a lui VICTOR BABEŞ a fost dublată de o înflăcărată activitate pentru dreptate socială.

Un alt reprezentant de frunte al microbiologiei româneşti a fost ION CANTACUZINO (1863-1934) medic şi biolog. Elev a lui A.O.KOVALEVSKI şi I.METCHNIKOFF face interesante cercetări de imunologie la nevertebrate, citate şi astăzi în literatura mondială, studiază tuberculoza, febra tifoidă, holera, scarlatina. Introduce pentru prima dată vaccinarea antituberculoasă la noi în ţară. Funcţionează ca profesor la

facultatea de medicină din Bucureşti iar între 1894-1896 este profesor de morfologie animală la Universitatea din Iaşi. A înfiinţat în anul 1921 Institutul de Microbiologie, Parazitologie şi Epidimioologie din Bucureşti care astăzi îi poartă numele. ION CANTACUZINO, savant progresist, înarmat cu o concepţie materialistă, s-a alăturat, la sfîrşitul secolului trecut, mişcării socialiste.

Alţi microbiologi români, mulţi dintre ei colaboratori şi elevi ai lui BABEŞ sau CANTACUZINO, au adus importante contribuţii la dezvoltarea microbiologiei româneşti şi mondiale.

C.LEVADITI (1874-1953) s-a remarcat prin cercetări în domeniul imunulogiei, virusologiei şi chimioterapiei. ST.S. NICOLAU (1896-1967) elev şi colaborator a lui LEVADITI este creatorul şcolii româneşti de virusulogie. A studiat bolile produse de virusuri, biologia virusurilor, imunitatea în viroze, etc. C.IONESCU-MIHAEŞTI (1883-1962) s-a distins prin valoroase lucrări privind fiziologia şi imunochimia bacilului tuberculozei, studiul poliomielitei, holerei, antraxului, etc. D.COMBIESCU (1887-1961) a făcut cercetări în domeniul imunulogiei, bacteriologiei şi epidemiologiei.

MIHAI CIUCA (1883-1969) s-a remarcat prin cercetări privind fenomenul de bacteriofagie. In anul 1921, în colaborare cu J.BORDET, pune în evidenţă capacitatea bacteriilor de a elibera spontan fagi(lizogenia). A studiat de asemenea etiologia şi patologia scarlatinei, rickettsiozelor, salmonelozelor, colibacilozelor şi a organizat campanii de eradicare a malariei în România şi în alte ţări.

In sfîrşit, numeroşi microbiologi români, în viaţă, au adus şi aduc importante contribuţiuni la ridicarea pe trepte tot mai înalte a microbiologiei româneşti.

x

x x

Microbiologia modernă se caracterizează în primul rînd prin faptul că microorganismele reprezintă materialul de cercetare pentru specialişti din domenii foarte diferite ale ştiin-

ţei: biologi, medici, biochimişti, geneticieni, chimişti, fizicieni şi chiar matematicieni. Abordarea cercetării microorganismelor din unghiuri şi cu metode aşa de diferite a făcut ca rezultatele obţinute să depăşească limitele microbiologiei, determinînd, în unele domenii ştiinţifice, o adevărată revoluţie ca şi acumularea a numeroase date de o excepţională importanţă pentru biologie, medicină, biochimie şi industrie.

Iată de ce studiul microbiologiei generale a devenit indispensabil pentru orice biolog modern, indiferent de specialitatea sa şi în egală măsură pentru biochimist, medic, agronom sau cel ce lucrează în industria fermentativă.

2. CARACTERELE GENERALE ŞI POZIŢIA MICROORGANISMELOR ÎN LUMEA VIE.

Microorganismele, cu excepţia celor cu structură subcelulară (virusurile), au ca unitate elementară de structură celula.

Celula la microorganisme, asemănătoare în general ca structură cu celula vegetală şi animală, prezintă unele particularităţi, în funcţie de grupul de microorganisme considerat. Aceste particularităţi structurake şi funcţionale au determinat împărţirea microorganismelor în două grupe (Eduard Chatton, 1932): procariote (bacterii şi cyanobacterii) şi eucariote (protozoare, fungi microscopici, alge microscopice).

I. Microorganisme procariote. Acestea fac parte din regnul Procaryotae, cu două diviziuni:

A. Cyanobacteria, cuprinde aproximativ 14oo specii cunoscute pînă nu de mult sub numele de alge albastre verzi. Se caracterizează prin fotosinteză de tip vegetal.

B. Bacteria, cu peste 12oo specii. La bacterii procesul de fotosinteză lipseşte sau dacă este prezent la unele specii prezintă caracteristici speciale.

II. Microorganisme eucariote. Fac parte atît din regnul vegetal cît şi din cel animal. Principalele grupe sînt:

A. Alge, circa 16.ooo specii. Sînt plante fotosintetizante ale căror celule au perete celulozic. Cuprind 6 clase:

1. Euglenophyta: unicelulare, flagelate, fără perete celular.
2. Chlorophyta: alge verzi uni sau pluricelulare, coenocitice, filamentoase.
3. Pyrrophyta: unicelulare, ciliate (dinoflagelate)
4. Chrysophyta: alge verzi-galbene, unicelulare, diatomei.
5. Phaeophyta: alge brune, multicelulare.
6. Rhodophyta: alege roşii, multicelulare.

B. Ciuperci: peste 1oo.ooo specii cunoscute. Plante

lipsite de clorofilă iar celulele cu perete chitinos.Cuprind:

a)ciuperci inferioare: (2 clase) — Arhymycetes, Phycomycetes

b)ciuperci superioare: (3 clase) — Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes

C.Protozoare: 15.ooo specii cunoscute. Animale unicelulare, heterogene, în general mobile. Cuprind patru clase:

1.Mastigophora (Flagelate)
2.Sarcodina (Amibe)
3.Sporozooa (Sporozoare)
4.Ciliophora (Ciliate).

III, Microorganisme necelulare: Virusurile.

Intre microorganismele procariote şi eucariote există diferenţe esenţiale structurale, funcţionale şi de compoziţie chimică. Acestea se referă la sistemul membranar, organizarea genomului, proprietăţile peretelui celular şi ale membranei citoplasmatice precum şi la alte particularităţi.(Tabelul nr.1).

Tabel nr.1

Diferenţele dintre celula procariotă şi eucariotă.

CARACTERUL	PROCARIOTE	EUCARIOTE
Nucleul	Primitiv.Materialul nuclear fără membrană proprie şi fără mitoză.	Nucelu veritabil cu membrană proprie, nucleol şi mitoză.
Dispunerea ADN	O singură moleculă de ADN dublu helical, nelegat de histone.	Unul sau mai mulţi cromozomi.ADN,obişnuit,legat de histone.
Compoziţia chimică a membranei citoplasmatice.	Lipsită de steroli (în unele cazuri numai la mycoplasme)	Conţine steroli.
Sistemul respirator	Face parte din membrana citoplasmatică sau mezozomi.Lipsesc mitocondriile.	Mitocondrii.
Aparatul fotosintetizant.	Absent sau asociat membranei citoplasmatice.	Cloroplaste.
Rizobomi	Tip 7o S	Tip 8o S.Cei din cloroplaste şi din mitocondrii de tip 7o S.
Curenţi citoplasmatici.	Absenţi sau excepţional,dar foarte slabi.	Prezenţi
Peretele celular	Conţine peptidoglicani(mureina).	Cînd este prezent conţine:celuloză, chitină,proteine, siliciu.
Flagelii	Facultativi şi de mărime submicroscopică.Fiecare cil e format dintr-o fibră de dimensiuni moleculare.	Facultativi.Cilii de mărime microscopică şi cu structură complexă(2o fibre 2x9+ +2).
Reproducere sexuată	Rară.Meioza absentă Zigot parţial şi tranzitoriu diploid(merozigot).	Prezentă.Meioză Zigot diploid.
Tipul de diviziune	Directă(sciziparitate)	Mitoză.
Reticul endoplasmic.	Absent	Prezent.

Virusurile ocupă o poziţie aparte în lumea microorganismelor întrucît au o structură subcelulară. Ele sînt unităţi infecţioase care stau la limita dintre viu şi neviu. Unitatea elementară de structură, virionul, posedă proprietăţi total diferite de cele ale celulei. Virionul nu conţine decît un singur acid nucleic (ADN sau ARN) iar singurii lor constituienţi organici, pe lîngă acidul nucleic sînt proteinele. Cu toate că uneori virionii pot conţine una sau cîteva enzime, echipamentul lor enzimatic este insuficient pentru a asigura un metabolism propriu şi o reproducere independentă. Virusurile se replică exclusiv plecînd de la materialul lor genetic în timp ce celua se reproduce plecînd de la suma integrată a tuturor constituienţilor ei. O celulă se naşte întotdeauna dintr-o celulă preexistentă în timp ce un virion nu se naşte nici odată dintr-un virion preexistent. Creşterea virusurilor implică sinteza independentă a acidului nucleic şi a proteinelor virale, care se vor asambla într-o structură organizată după sinteză. Creşterea celulară constă într-o sporire cantitativă a tuturor constituenţilor şi în cursul ei individualitatea ansamblului este păstrată constantă. Ea îşi găseşte expresia finală în sporirea numărului de celule graţie procesului de diziune.

PARTEA I-a.MICROORGANISMELE PROCARIOTE.

3. BACTERIILE

Bacteriile reprezintă un grup de microorganisme procariote, unicelulare, de dimensiuni microscopice, cu morfologie variată şi cu un echipament enzimatic mai mult sau mai puţin complex în funcţie de specie.

3.1.Morfologia bacteriilor.

Fiecare bacterie prezintă o formă şi dimensiuni caracteristice, dar supuse, între anumite limite,variabilităţii în funcţie de condiţiile mediului înconjurător de vîrsta celulelor, iar pentru unele specii şi de etapele ciclului lor evolutiv.

Forma şi dimensiunile bacteriilor sînt elemente importante pentru difefenţierea şi clasificarea lor. Morfologia tipică a bacteriilor este dată de aspectul pe care îl prezintă celulele tinere, active din punct de vedere fiziologic, în condiţii favorabile de mediu.

In general, la bacterii, se disting trei tipuri morfologice fundamentale: rotund (cocoid), alungit-cilindric(bacilar) şi spiralat.

Tipul cocoid - cuprinde baterille numite generi coci. Cocii sîmt sferici, elipsoidali sau neregulaţi, cu diametrele celulei aproximativ egale. Celulele sînt sferice la stafilococi(*Staphylococcus aureus*), elipsoidale la streptococi (*Streptococcus viridans*), lanceolate la pneumococi (*Diplococcus pneumoniae*), reniforme la gonococi(*Neisseria gonorrhoeae*) şi meningococi (*Neissetia meningitidis*).

Unul din criteriile de identificare şi clasificare a cocilor îl constituie modul de grupare a celulelor după diviziune,determinat de planurile după care se face diviziunea şi de tendinţa celulelor surori de a rămîne unite unele de altele. Cînd diviziunea se face după un singur plan iar celulele surori rămîn izolate, acestea poartă numele de micrococi (*Micrococcus uraee*). Dacă celulele surori rămin ataşate cîte două, în perechi, formează diplococii(pneumococ,gonococ,menin-

gococ), iar dacă tendința de atașare a celulelor este mai pronunțată, se formează lanțuri mai lungi sau mai scurte de coci, constituind forma de streptococ. In urma unei diviziuni după două planuri, perpendiculare între ele, celulele surori rămîn atașate cîte patru formînd tetrade (Gafkia tetragena). După o diviziune în trei planuri perpendiculare rezultă pachete cubice de coci numite sarcine (Sarcina lutea). Atunci cînd diviziunea se face după mai multe planuri neregulate, celulele se dispun sub formă de ciorchine alcătuind stafilococul (Fig.1.).

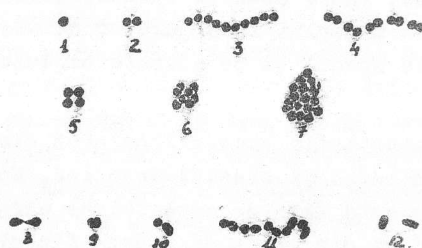


Fig.nr.1.Diferite tipuri de coci.
1:micrococ; 2,8,9,10:doplococi; 3,4,11: streptococi; 5:tetrade; 6:sarcine; 7:stafilococ; 12: cocobacil.

Tipul bacilar. Din acest tip morfologic fac parte bacterii cilindrice, sub formă de bastonașe cu diametrul longitudinal de cîteva ori mai mare decît cel traversal. Forma bacililor prezintă unele variații care se referă la marginile și extremitățile celulelor (Fig.2.). Marginile pot fi paralele



Fig.nr.2,Diferite tipuri de bacili.

sau sînt depărtate la una sau ambele extremități dînd aspectul de măciucă sau haltere (Corynebacterium diphteriae), sau, din contra, sînt apropiate la capete, bacilul avînd aspectul de fus (Fusobacterium fusiforme). La majoritatea speciilor extremitățile sînt rotunjite, la unele însă sînt retezate(Bacillus anthracis).

Bacilii pot fi grupați în diplo-diplobacili, sau în lanțuri - streptobacili. Unii se dispun sub formă de palisade ori pachete de ace cu gămălie (Corynebacterium diphteriae) iar alții formează grupări caracteristice de rozetă sau stea (Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium stellatum).(Fig.3.).



Fig.nr.3.Modul de grupare al unor bacili.

Tipul spiralat cuprinde bacterii cilindrice, alungite dar care prezintă curburi ale axului longitudinal. Se deosebesc trei subtipuri:

a)Vibrionul (Vibrio cholerae) bacterie în formă de virgulă.

b)Spirilul (Spirillum volutans) în formă se spirală rigidă, cu mai multe ture de spiră.

c) Spirocheta (Treponema pallidum, Leptospira, Borrelia) în formă de spirală, cu mai multe ture de spiră dar flexibile. (Fig.4.).



Fig.nr.4.Vibrioni(a), spirili și spirochete(b).

In afară de aceste tipuri morfologice fundamentale există și un tip morfologic intermediar, situat între tipul cocoid și bacilar, numit tip cocobacilar. La acesta cele două diametre ale celulei se apropie de unitate.

Există însă și forme bacteriene aberante, antipice, de involuție, care apar în culturile bacteriene sub acțiunea unor factori nefavorabili din mediu. Așa sînt bacteriile globulase-gigant, filamentoase sau sub formă de Y.

3.1.2. Dimensiunile bacteriilor

Bacteriile au dimensiuni de ordinul micronilor din care cauză nu pot fi observate decît la microscop. Dimensiunile cocilor variază între 0,2 și 2 μ .Bacilii au diametrul longitudinal de 0,5 - 10 μ iar cel transversal de 0,3 - 2 μ .Dimensiunile spirililor și spirochetelor variază între 0,25 și 3,5 μ diametru transversal și 6 - 100 μ diametru longitudinal. Dimensiunile cîtorva specii bacteriene sînt trecute în tabelul nr.2.

Tabel nr.2

Dimensiunile medii ale unor specii bacteriene

Specia	microni	Specia	microni
Staphylococcus aureus	0,8-1,0	Salmonella typhi	3 / 0,8
Streptococcus pyogenes	0,6-1,0	Vibrio cholerae	0,3 - 0,6/5
Diplococcus pneumoniae	0,5-1,25	Serratia marcescens	0,75
Neisseria gonorrhoeae	0,6-1,0	Micrococcus melitensis	0,30
Bacillus mycoides	7-14/1,4	Spirillum sp.	100/2,5
Bacillus anthracis	6-10/1,0	Treponema palidum	0,25-0,3/14

Densitatea sau greutatea specifică a bacteriilor este apropiată de a apei, variind între 1,07 și 1,30, funcție de predominarea în compoziția lor chimică a lipidelor, proteinelor, glucidelor, acizilor nucleici și sărurilor minerale. Acumularea lipidelor diminuiază densitatea celulelor bacteriene în timp ce acumularea celorlalte substanțe o măresc.

Volumul celulei bacteriene poate fi calculat și exprimat în μ^3. El variază funcție de celelalte dimensiuni(tabel nr.3).

Tabel nr.3

Volumul unor bacterii

Specia	μ^3
Bacillus anthracis	8,75
Salmonella typhi	1,5
Micrococcus sp.	0,52
Brucella sp.	0,011
Pasteurella tularensis	0,004

Suprafața bacteriilor de asemenea poate fi calculată.Bacillus anthracis are o suprafață de 33 μ^2 iar Brucella melitensis numai 0,25 μ^2.

3.2. Structura celulei bacteriene

Celula bacteriană poate fi constituită din două tipuri de elemente structurale:

a)elemente structurale constante, prezente la toate bacteriile: perete celular, membrană citoplasmatică, citoplasmă,material nuclear, organite citoplasmatice, incluziuni citoplasmatice.

b)elemente structurale inconstante, întîlnite numai la unele specii bacteriene: capsula și stratul mucos, flagelii, pilii, sporul, cromatoforii.

3.2.1. Elemente structurale constante

3.2.1.1. Peretele celular

Formațiune externă a celulei bacteriene,peretele celular acoperă membrana citoplasmatică și poate, la rîndul său, să fie acoperit , la unele specii, de o capsulă sau strat mucos. Cu tehnicele microscopice obișnuite peretele celular este greu de pus în evidență, deoarece, la celulele tinere, turgescente, el aderă foarte strîns de membrana citoplasmatică. A putut fi însă evidențiat prin tehnici selective de colorare sau la microscopul electronic.

Peretele celular reprezintă 15-30% din greutatea uscată a unei celule bacteriene și se caracterizează printr-o mare rigiditate care asigură forma celulei. Rigiditatea și rezistența peretelui celular sînt date de prezența mureinei, un peptidoglican. Acest polimer formează un fel de rețea rigidă. In afară de mureină, compus ubiquitar la bacterii, el conține și alți compuși chimici, variabili după specie.

Ultrastructura peretelui celular este diferită la cele două grupe mari de bacterii: Gram pozitive și Gram negative.

La bacteriile Gram pozitive are o grosime de 2o-8o nm și prezintă un aspect relativ omogen. Este format dintr-o pătură de mureină și acid teicoic, în proporții aproape egale și fără a prezenta zone distincte.(Fig.5.).

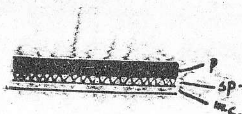


Fig.nr.5.Ultrastructura peretelui celular la bacteriile Gram pozitive. p:pătura de mureină şi acid teicoic; sp.: spaţiu periplasmatic; m.c: membrana citoplasmatică.

Bacteriile Gram negative au un perete celular mai subţire (10-15 mm) dar cu o structură stratificată complexă.Caracteristica este prezenţa, la exteriorul păturii rigide de mureină, a unui înveliş extern, cu o structură tristratificată,gros de 9-13 mm. Acest __manşon extern__ este format din lipopolizaharide şi lipoproteine. El nu constituie o formaţiune rigidă. Pătura de mureină este subţire şi nu reprezintă decît 10% din greutatea uscată a peretelui celular. La unele bacterii Gram negative (__Escherichia coli__, __Proteus__, __Salmonella__ ş.a.) pătura de mureină aderă intim de manşonul extern astfel încît, pe secţiuni ultrafine, se observă cu greu fără o coloraţie specială(Fig.6.).



Fig.nr.6.Ultrastructura peretelui celular la bacteriile Gram negative. e:manşon extern; m: mureină; sp: spaţiu periplasmic; m: membrana citoplasmatică.

La alte specii (__Moraxella__, __Vitreoscilla__, __Spirillum serpens__)pătura de mureină vine în contact cu manşonul extern numai din loc în loc (Fig.7), astfel că pe secţiuni ultrafine se apare ca o



Fig.nr.7.Ultrastructura peretelui celular la Moraxella,Vitreoscilla şi Spirillum.

zonă rectilinie, bine vizibilă, peste care manşonul extern prezintă numeroase ondulaţii. La bacteriile spiralate şi vibrioni pătura de mureină pare să vină foarte puţin în contact cu manşonul extern, în schimb ea este intim asociată cu membrana citoplasmatică (Fig.8). Aceste ultime bacterii au proprietatea



Fig.nr.8 . Ultrastructura peretelui celular la spirochete.

de a se transforma,în culturile vechi, în forme sferice,multă vreme considerate ca o etapă a unui ciclu evolutiv, un fel de închistare. In realitate este vorba de un fenomen de degenerescenţă care morfologic se manifestă prin desprinderea manşonului extern de pe corpul celular formînd o sferă în care este înrulat corpul bacteriei. Aceasta îşi conservă forma cilindrică datorită mureinei care se găseşte în contact strîns cu membrana citoplasmatică. In culturile foarte vechi aceste forme, în final, lizează.

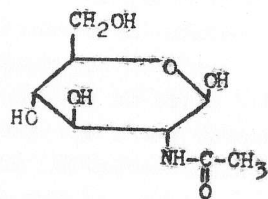
Din punct de vedere al compoziţiei chimice,caracteristică pentru peretele celular este prezenţa mureinei. Mureina este un heteropolimer format din două molecule glucidice diferite: N-acetilhexozamină şi acid N-acetilmuramic, legate de 4 pînă la 8 acizi aminici. Aceşti acizi aminici sînt reprezentaţi de L-alanină, D-alanină, acid D-glutamic, asociaţi cu L-lizina sau cu acidul mezo diaminopimelic. Acidul muramic, D-alanina, acidul D-glutamic şi acidul mezo diaminopimelic sînt întîlniţi numai la procariote şi sînt specifici peretelui celular.

La bacteriile Gram negative, manşonul extern este constituit din lipopolizaharide responsabile de specificitatea antigenică somatică (antigen O) şi lipoproteine cu proprietăţi de endotoxine.

Pentru bacterii Gram pozitive sînt caracteristici acizii teicoici, polimeri lineari formaţi din mai multe unităţi de glicerol sau ribitol, legate de esteri fosfaţi. Se pare că

acizii teicoici joacă un rol esențial în activitatea și stabilitatea membranei citoplasmatice subiacente, intervenind în special, în schimbul ionic. Posedînd o încărcare electrică negativă, acizii teicoici sînt parțial responsabili de încărcarea electrică negativă a celulelor bacteriene.

In fig.9, 10 și 11 sînt date structurile chimice ale unor constituenți ai peretelui celular.



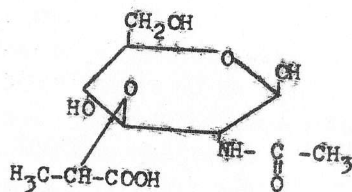
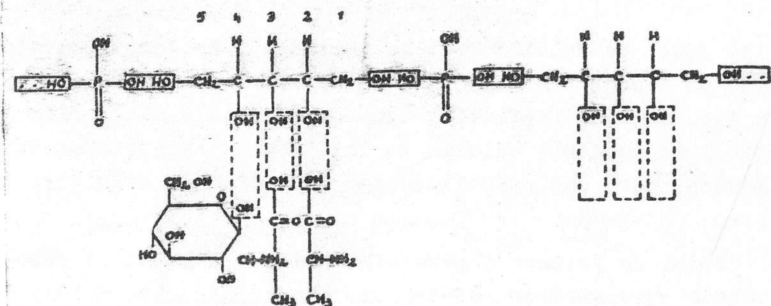


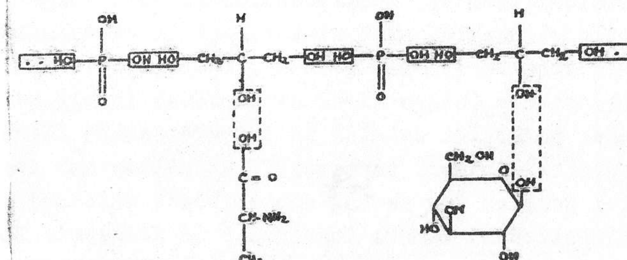
Fig.nr.9.N-acetilglucozamină Fig.nr.10.Acidul N-acetilmuramic

Fig.nr.9.N-acetil-
glucozamină

Fig.nr.lo.Acidul N-acetil-
muramic



Poliribitolfosfat



Poliglicerolfosfat

Fig.nr.11. Acizii teicoici.

Semnificația biologică a peretelui celular. Principala funcție a peretelui celular este menținerea(datorită rigidității sale) formei normale a celulei și protejarea ei față de factorii nefavorabili din mediu, în primul rînd față de variațiile de presiune osmotică. Faptul că bacteriile Gram pozitive au un perete celular mai gros explică și presiunea osmotică celulară mai mare (15-2o atmosfere) decît la bacteriile Gram negative (6-7 atmosfere) la care peretele celular este mai subțire. El are rol, de asemenea, în adsorbția și fixarea la suprafața celulei a unor substanțe care apoi vor pătrunde în celulă. Peretele celular participă la diviziunea celulei bacteriene formînd septul parietal transversal. Unii constituenți parietali au rol de receptori pentru fixarea bacteriofagilor. Datorită rigidității sale,peretele

celular joacă un rol indirect în deplasarea bacteriilor,reprezentînd un suport rigid pe care se sprijină cilii în contracţiile lor. Atît la bacteriile Gram negative cît şi la cele Gram pozitive, în peretele celular se întîlnesc substanţe puternic antigenice, care dau specificitatea antigenică a celulelor respective.

Modul de formare a peretelui celular a putut fi cunoscut graţie cercetărilor privind sinteza peptidoglicanului (mureinei). Celulele bacteriene posedă sistemele enzimatice care realizează biosinteza peptidoglicanului în trei etape. Precursorii peptidoglicanului sînt sintetizaţi în citoplasmă (etapa I-a), apoi transferaţi pe un transportor lipidic al membranei citoplasmatice (etapa II-a) şi în final integraţi în peptidoglicanul peretelui celular în formare (etapa III-a), prin asociere cu alţi polimeri parietali. Penicilina inhibă sinteza peretelui celular (nu se mai sintetizează mureina) iar lizozimul hidrolizează mureina insolubilă în fragmente solubile.

Unele bacterii sînt, în mod normal, lipsite de perete celular. Acestea sînt <u>Mycoplasmele</u>, un grup de bacterii parazite intracelulare, unde izotonismul celulei parazitate le asigură supravieţuirea în lipsa peretelui.

3.2.1.2. <u>Protoplaştii şi sferoplaştii</u>

Rolul mureinei în asigurarea rigidităţii peretelui celular poate fi evidenţiat prin tratarea celulelor bacteriene cu lizozim, care, aşa cum am văzut, hidrolizează mureina. In consecinţă, adăugarea lizozimului unei culturi bacteriene produce liza prin depolimerizarea mureinei. Dacă această operaţie se realizează într-un mediu izotonic sau uşor hipertonic,atunci se constată că celulele bacteriene devin sferice, indiferent de forma lor normală,(Fig.12.).

Examenul electronomicroscopic al secţiunilor ultrafine prin bacterii Gram pozitive, tratate cu lizozim în condiţiile amintite, arată că celulele sînt lipsite total de perete celular şi protoplasma este limitată numai de membrana citoplasmatică. Acește celule se numesc <u>protoplaşti</u> şi reprezintă ce-

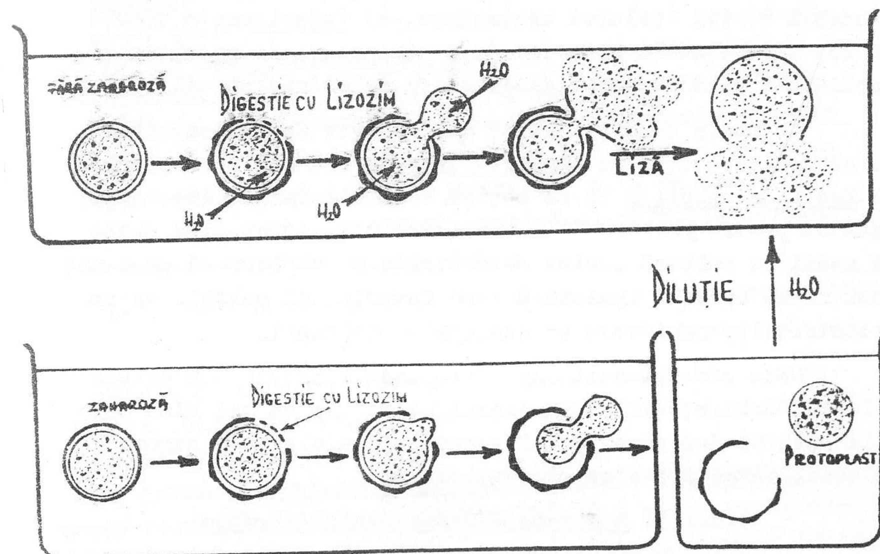


Fig.nr.12. Protoplastul.

lule cu structură completă dar lipsite de perete celular.

La bacteriile Gram negative lizozimul nu distruge decît pătura de mureină, manşonul extern rămînînd intact în jurul celulei. Aceste formaţiuni poartă numele de **<u>sferoplaşti</u>** şi se deosebesc de protoplaşti prin faptul că peretele lor celular este numai parţial distrus. Sferoplaştii pot fi obţinuţi şi prin tratamentul celulelor bacteriilor Gram negative, în curs de multiplicare, cu penicilină. In acest caz este împiedicată sinteza mureinei. Sferoplaştii obţinuţi prin tratarea celulelor tinere cu doze mici de penicilină sînt capabili să se multiplice în medii lichide dar, în cursul multiplicării lor succesive îşi pierd manşonul extern şi devin protoplaşti.

Spre deosebire de sferoplaşti, protoplaştii nu se pot multiplica în medii lichide ci numai pe medii solide. In aceste condiţii însă diviziunea lor este anarhică rezultînd celule de mărimi diferite cu un conţinut variabil de ADN.Rezultă, prin urmare, că dacă peretele celular nu este absolut indis-

pensabil vieții celulei bacteriene, el îndeplinește totuși
un rol important în procesul de diviziune și de repartizare
echitabilă a informației genetice și materialului celular.

In unele condiții, bine determinate, a fost posibil
ca din sferoplaștii de Escherichia coli sau din protoplaștii
de Bacillus subtilis să se obțină celule normale. Important
este că pentru protoplaști această revenire nu are loc decît
în medii de cultură strict determinate și se pare că prezența
unui mediu compact (gelatină 25%) favorizează asamblarea con-
stituienților parietali pe suprafața membranei.

Dacă protoplaștii sau sferoplaștii provin din celule
ciliate, mobile, ei își păstrează cilii dar nu mai sînt mo-
bili ceea ce dovedește rolul peretelui celular, ca suport
mecanic, în mobilitatea bacteriilor.

3.2.1.3. Membrana citoplasmatică și struc-
turile membranale(unit membrana).

Membrana citoplasmatică limitează citoplasma celulei
bacteriene și este aderentă de suprafața internă a perete-
lui celular. Observată, pe secțiuni ultrafine, la microscopul
electronic, ea prezintă o structură tristratificată tipică
tuturor membranelor: două foițe dense la electroni limitînd
o foiță internă transparentă. Grosimea membranei este de 10
nm și nu prezintă pori. Suprafețele externă și internă sînt
relativ netede. Foița centrală transparentă este foarte bo-
gată în particule ceea ce presupune că este formată mai
ales din proteine.

Din punct de vedere chimic este formată din: 40-70%
proteine, 15-40% lipide și 10-20% glucide. Cu excepția myco-
plasmelor ea nu conține colesterol. Adesea de membrana cito-
plasmatică aderă ribozomi.

Membrana citoplasmatică joacă un rol esențial în via-
ța celulei bacteriene. Prin proprietățile sale de semiper-
miabilitate, ea controlează pătrunderea și ieșirea din cito-
plasmă a ionilor și diferiților metaboliți. Cele mai multe
dintre substanțele nutritive traversează membrana citoplasma-

tică prin procese active asigurate de sisteme enzimatice,nu-
mite permeaze. Acestea permit bacteriilor să concentreze, în
citoplasmă, unele substanțe de circa 500 ori față de concen-
trația lor îm mediul extern. In membrana citoplasmatică se
găsesc încă numeroase enzime cum sînt enzimele respiratorii
(lactat dehidrogenaza, NADH dehidrogenaza, succinat dehidro-
genaza, citocromi, quinonele, ș.a.) sau acelea care intervin
în sinteza mureinei și acizilor teicoici. Alte enzime sînt
localizate între membrana citoplasmatică și peretele celular
purtînd numele de enzime periplasmice.

Toate acestea dovedesc că suprafața membranei reprezintă
o regiune extrem de activă și importantă pentru viața celulei.

Membrana citoplasmatică este,adesea,prevăzută cu nume-
roase invaginări veziculare, lamelare sau tubulare, care pă-
trund în citoplasmă. Acestea, la un loc cu membrana citopla-
smatică, formează sistemul membranar unic sau "unit membrána"
deoarece toate sînt în legătură directă. Din acest motiv su-
prafața membranei citoplasmatice nu este în mod necesar în ra-
port direct cu mărimea celulei. Există, în schimb, un raport
direct între suprafața totală a membranei(gradul ei de inva-
ginare) și intensitatea activității metabolice deoarece, da-
torită sistemelor enzimatice pe care le conține, ea are im-
portante funcții în metabolismul energetic, funcții care în
celulele eucariote sînt îndeplinite de organite specializate
(mitocondriile).

La bacteriile Gram pozitive, invaginările membranei ci-
toplasmatice sînt cunoscute sub numele de mezozomi. Microsco-
pia electronică a arătat că mezozomii se prezintă ca niște
pungi formate de membrana citoplasmatică, conținînd vezicule,
tubuli și / sau lamele membranoase. Adesea ei sînt legați de
ADN bacterian. Cînd celulele bacteriene se transformă în pro-
toplaști și sînt introduse în medii hipertonice pungile me-
zozomice se deschid și eliberează unul sau mai mulți tubuli.
Acești tubuli par să fie constituiți dintr-o succesiune de
vizicule mici ceea ce le conferă aspectul de șirag de perle.
Se pare că mezozomii conțin unul sau mai mulți astfel de
tubuli,înrulați în punga mezozomică.

Tubulii mezozomici au putut fi separați și cercetați sub aspect morfologic și enzimatic . Astfel, s-a constatat că mezozomii nu posedă funcții proprii. Dacă pînă nu de mult se considera că mezozomii la bacterii au funcții respiratorii, cercetări recente dovedesc că ei conțin de 3o pînă la 8o ori mai puțin succinat-dehidrogenază și dehidrogenaze NADH-dependente decît membrana citoplasmatică și deci nu li se pot atribui funcții respiratorii. Pe de altă parte, rolul lor în sinteza peretelui celular și în procesele de excreție, pare să fie similar celui al membranei citoplasmatice.

La bacteriile Gram negative mezozomii sînt mai puțin dezvoltați și nu mai prezintă același aspect. La acestea ei au forma unor membrane înrulate care încă nu au putut fi izolate și studiate. Recent însă, la unele bacterii Gram negative (Caulobacter și Achromobacter) s-au descris structuri membranare foarte asemănătoare cu mezozomii de la bacteriile Gram pozitive ceea ce sugerează că prezența mezozomilor nu este strîns legată de caracterul Gram pozitiv.

La unele bacterii care oxidează amoniacul în nitriți și nitriții în nitrați (Nitrobacter, Nitrosomonas, Nitrocystis) s-au descris structuri membranare foarte dezvoltate, localizate fie la periferia citoplasmei fie în centrul ei, dar legate, cel puțin într-un punct, de membrana citoplasmatică, reprezentînd invaginări ale acesteia. S-a dovedit că aceste structuri membranare conțin enzimele răspunzătoare de procesele de oxidare respective, dar încă nu se știe dacă aceste enzime se găsesc și în membrana citoplasmică sau este de fapt vorba de o adevărată diferențiere funcțională.

Structuri membranare, bine dezvoltate, sînt întîlnite la bacteriile fotosintetizante și la cyanobacterii, la care reprezintă sediul pigmenților fotosintetizanți.

Semnificația biologică a "unit membranei". Membrana citoplasmatică reprezintă bariera osmotică a celulei bacteriene. Semipermiabilitatea ei asigură o rapidă echilibrare a ionilor de sodiu între interiorul și exteriorul celulei și o concentrare intracelulară a ionilor de K^+ și Mg^{++} precum și a unor metaboliți, chiar dacă concentrația lor extracelulară

este mai mică. Transportul prin membrană a substanțelor nutritive sau a celor rezultate din metabolism este realizat în mod activ de sistemul permeazelor.

Membrana citoplasmatică, datorită numeroaselor enzime respiratorii pe care le conține, reprezintă o importantă structură cu rol energetic. De asemenea, ea coordonează creșterea și diviziunea celulară inițiind replicarea cromozomului bacterian și asigură separarea cromozomilor fii prin formarea septului transversal de diviziune a celulei.

Funcțiile membranei citoplasmatice, în esență, se regăsesc și la nivelul mezozomilor care sînt lipsiți de proprietăți funcționale specifice. Este posibil ca mezozomii să reprezinte mijlocul prin care celula bacteriană își mărește suprafața internă. Această ipoteză se sprijină pe descoperirea recentă că formarea mezozomilor răspunde unei creșteri a cerințelor celulei în sisteme enzimatice.

3.2.1.4. Citoplasma.

Citoplasma este un sistem coloidal complex, format din proteine, lipide, glucide, apă, săruri minerale și o seamă de substanțe de altă natură, ce se găsesc într-un raport variabil funcție de specie, de vîrsta celulei și de condițiile de mediu. Ea reprezintă o masă amorfă densă, strîns aderentă de peretele celular (la celulele tinere), omogenă și intens colorabilă.Pe electronofotografii ea apare alcătuită dintr-un număr extrem de mare de granule aderente unele de altele, suspendate într-o matrice lipsită de structură, formată dintr-o soluție de săruri minerale, substanțe organice și metaboliți. In această masă granulară nediferențiată se pot observa ribozomii, granulații diferențiate cu diametrul de 15o Å.

Caracteristic pentru citoplasma bacteriană este marele său conținut în ARN care îi imprimă intense proprietăți bazofile. Celulele tinere au o bazofilie mult mai pronunțată și pe măsură ce îmbătrînesc această proprietate se pierde odată cu apariția unui număr mare de vacuole și cu îndepărtarea citoplasmei de peretele celular.

Deși se consideră că, în general, este lipsit de

curenţi intracitoplasmatici, observaţiile făcute la microscopul în contrast de fază arată existenţa unor particule şi granulaţii în mişcare ceea ce ar dovedi că există curenţi citoplasmatici dar că aceştia sînt foarte slabi şi greu observabili din cauza volumului mic al celulei.

In interiorul citoplasmei se găsesc: materialul nuclear, organitele citoplasmatice şi incluziunile.

3.2.1.5.Materialul nuclear sau nucleul bacterian

Bacteriile fiind procariote nu posedă un nucleu veritabil cu membrană proprie şi un număr determinat de cromozomi, ca la celulele eucariote, din care cauză, adesea, este desemnat sub numele de material nuclear.

Materialul nuclear la bacterii este localizat, de regulă, în regiunea centrală a celulei. Are o densitate mai mică decît citoplasma şi la microscopul electric se prezintă ca o zonă mai clară (invers decît la eucariote). Citoplasma bacteriană are o densitate neobişnuit de mare.

Pentru prima dată nucleul bacterian a fost pus în evidenţă de PIEKARSKY în 1937, printr-o coloraţie specială.Dificultăţile de observare a nucleului la microscopul fotonic sînt determinate de intensa bazofilie a citoplasmei (comcentraţie mare de ARN).Totuşi, prin coloraţii speciale selective ori prin hidroliză acidă sau enzimatică (ribonuclează), la microscopul fotonic s-a putut observa materialul nuclear bacterian sub formă foarte variabilă, în funcţie de specie sau de starea fiziologică a celulelor bacteriene. La unele specii (Vitreoscilla şi la cyanobacterii) materialul nuclear pare să fie difuz şi greu de diferenţiat de citoplasmă. La alte specii se prezintă sub formă de reţea (Moraxella) sau de granule şi bastonaşe cu aspect de haltere, de V sau U (Escherichia coli Bacillus). Observaţiile făcute pe celule de Escherichia coli la microscopul cu contrast de fază au arătat că aceste variate aspecte ale materialului nuclear, corespund unor etape diferite ale procesului de diviziune.

Cele mai preţioase informaţii asupra structurii fine a nucleului le-au adus cercetările efectuate la microscopul electronic, pe secţiuni ultrafine. Astfel de cercetări au arătat lipsa membranei nucleare, caracter comun la toate procariotele, şi faptul că materialul nuclear formează o regiune centrală, de mărime şi forme variabile, constituită din filamente foarte fine, cu diametrul de 20-50 Å, dispuse sub formă de fascicole torsionate cu aspectul general al unei jurubiţe de aţă. La speciile bacteriene la care materialul nuclear este difuz, pe secţiunile ultrafine, nu se mai observă filamente bine delimitate ci acestea sînt complet dispersate în citoplasmă.

In 1963 J.CAIRNS, prin tehnici extrem de fine şi laborioase, a izolat şi studiat materialul nuclear de la Escherichia coli, dovedind că este format dintr-o singură moleculă circulară, gigant, de ADN dublucatenar, cu extremităţile moleculei reunite. Aceasta face ca materialul nuclear bacterian să fie considerat omolog unui cromozom de la celulele eucariote, noţiunea de nucleu bacterian fiind improprie. Este vorba mai curînd de un cromozom primitiv, puţin organizat, denumit frecvent cromozom bacterian. Lungimea totală a moleculei de ADN la Escherichia coli este de 1,2 mm iar diametrul ei mediu de 25 Å.

Deşi tehnicile aplicate de J.CAIRNS nu au putut fi utilizate şi în cazul altor specii bacteriene, se presupune totuşi că lungimea cromozomului este relativ identică. Excepţie fac doar mycoplasmele, la care celula conţine o cantitate mică de ADN. Cromozomul la aceste bacterii este tot circular dar nu măsoară decît 260 μ (Mycoplasma hominis). Această considerabilă diminuare de informaţie genetică ar putea fi cauza sau consecinţa vieţii lor parazitare.

In general, molecula de ADN bacterian este de 1000 ori mai lungă decît celula bacteriană, dar în interiorul citoplasmei ea este înrulată foarte strîns.

Structura primitivă a cromozomului bacterian permite, prin lipsa membranei proprii, un contact direct între ADN şi ribozomii din citoplasmă şi în consecinţă un transfer rapid

de informaţie genetică. La microscopul electronic s-a putut observa că ADN bacterian este acoperit, în unele regiuni, de numeroşi poliribozomi. Aceasta sugerează că ARN mesager se leagă de ribozomi şi formează poliribozomii chiar de la începutul sintezei sale pe ADN, înainte ca transcripţia să se fi terminat. La eucariote, la care ADN nuclear este izolat de ribozomi prin m mbrana nucleară, transportul informaţiei genetice în citoplasmă necesită procese mult mai complexe.

In condiţiile de cultură normale, în faza staţionară, celulele bacteriene, posedă un singur cromozom (uninucleate). In faza de multiplicare activă(logaritmică)însă,ele apar multinucleate, cu 2-4 cromozomi genetic identici şi care provin din replicarea cromozomului parental. Existenţa unor celule bacteriene multinucleate se datoreşte lipsei de sincronizare dintre ritmul de creştere şi ritmul de diviziune celulară. La celulele în faza staţionară (de repaus) replicarea cromozomului se face sincron cu diviziunea celulei şi separarea celulelor surori. La celulele tinere, pe medii de cultură bogate replicarea ADN este foarte rapidă, astfel încît cromozomul se replică de mai multe ori pînă cînd celulele surori se separă complet, în urma diviziunii. Dar, indiferent de numărul cromozomilor din celulă, din punct de vedere genetic, bacteriile sînt haploide. Apariţia bacteriilor multinucleate se mai poate datora şi influenţei nefavorabile a unor factori de mediu, care opresc diviziunea celulei dar nu afectează replicarea cromozomului. De exemplu, penicilina inhibă formarea peretelui celular, la bacteriile Gram pozitive, prin blocarea sintezei mureinei, In aceste condiţii celulele nu se mai pot divide dar replicarea cromozomului are loc. In consecinţă apar celule gigant,globuloase sau filamentoase, multinucleate.

La bacterii, ca la toate procariotele de altfel, nu întîlnim procese de mitoză. Cromozomul bacterian se replică în două molecule egale, identice din punct de vedere genetic, care apoi se separă una de alta (Fig.13.).

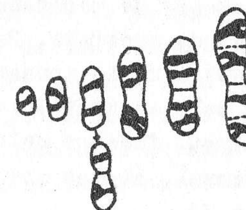


Fig.nr.13. Replicarea crompzomului bacterian.

Replicarea cromozomului bacterian ridică însă unele probleme încă insuficient elucidate, mai ales în legătură cu mecanismul replicării şi separării moleculelor surori precum şi cu mecanismul care controlează acest proces coordonîndu-l cu diviziunea celulei.

Cea mai plauzibilă pare să fie <u>ipoteza "repliconului"</u> (<u>F.JACOB</u>, <u>S.BRENNER</u>,şi <u>F.CUZIN</u>, 1963). Aceasta sugerează că sistemul enzimatic care controlează replicarea cromozomului bacterian este localizat în membrana citoplasmatică, într-un punct în care cromozomul este ataşat de aceasta, fie direct fie prin intermediul unui mezozom. Punctul din membrana citoplasmatică de care este ataşat cromozomul şi care declanşează replicarea poartă numele de <u>"replicon"</u> sau <u>"iniţiator"</u> (Fig. 14 a). In acest punct o catenă a dublu-helixului de ADN,anume aceia care a servit ca matriţă în ciclul precedent de replicare, este închisă în timp ce cealaltă catenă, nou sintetizată, se deschide şi se ataşează de membrana citoplasmatică, într-un nou punct, aproape de primul (Fig.14 b). In acest moment începe replicarea cromozomului dar pentru ca ea să continue este nevoie, dat fiind faptul ca sistemul enzimatic de replicare rămîne fixat în membrană, ca cromozomul să se deruleze astfel încît să treacă prin dreptul lui (fig.14 c). Pe fiecare catenă de ADN, fixată pe membrană, se sintetizează catenele complimentare. In timpul replicării cromozomului, între cele două puncte de fixare, membrana citoplasmatică creşte inelar, astfel încît cei doi cromozomi sînt separaţi

între ei, fiecare rămînînd atașat de membrana citoplasmatică, de o parte și de alta a zonei de creștere. Peretele celular apoi, prin invaginare, va contribui la formarea septului care separă, în final, cele două celule surori. Astfel, cînd replicarea cromozomului s-a terminat, fiecare celulă va poseda un cromozom identic cu cel parental, atașat într-un punct de membrana citoplasmatică (fig.14 d).

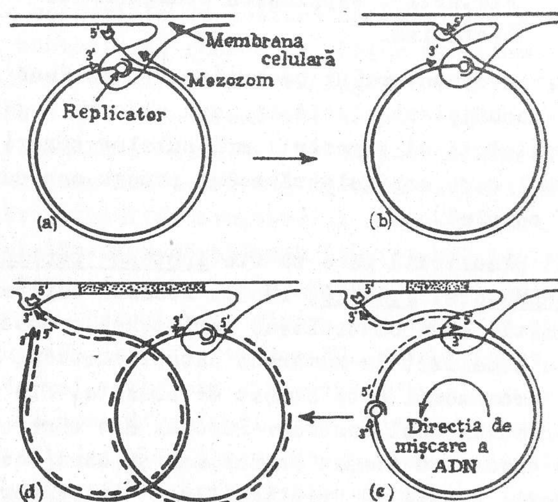


Fig.nr.14.Reprezentarea schematică a ipotezei repliconului.

3.2.1.6. Organitele citoplasmatice

In citoplasma bacteriană, în anumite condiții de observare, pot fi puse în evidență organitele citoplasmatice: ribozomii și vacuolele.

a)Ribozomii

Citoplasma celulelor tinere, în faza activă de multiplicare, pe medii bogate, conține un foarte mare număr de ribozomi.

Ribozomii sînt organite de formă mai mult sau mai puțin

sferică, cu diametrul de pînă la 20 nm. Numele lor provine de la faptul că conțin ARN în proporție de 60% și proteine 40%. ARN ribozomal este de trei tipuri: ARN - 16 S, ARN - 23 S și ARN - 5 S. Ei pot fi izolați prin ruperea peretelui celular (ultrasunete) și ultracentrifugare. Spre deosebire de celulele eucariote la care ribozomii au constanta de sedimentare 80 S, la bacterii și celelalte procariote, constanta lor de sedimentare este 70 S.

Observați la microscopul electronic ribozomii se prezintă formați din două părți de mărimi inegale. Acestea pot fi separate cu ajutorul unor agenți fizici și apoi se pot reasambla din nou. Cele două subunități au constante de sedimentare diferite: subunități 30 S și 50 S. Subunitățile 30 S sînt formate din ARN-16 S și 20-21 molecule de proteine diferite, în timp ce subunitățile 50 S conțin ARN - 23 S și ARN - 5 S asociat cu 27-35 molecule proteice diferite (Fig.15).

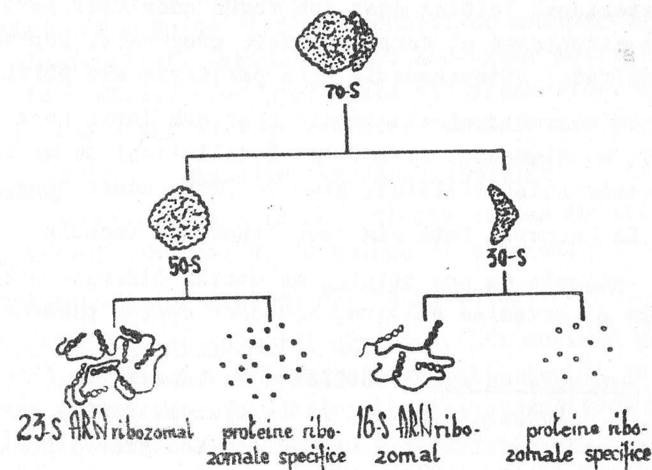


Fig.nr.15.Structura ribozomului bacterian.

In celulele intacte ribozomii formează agregate de mărimi variabile, numite poliribozomi(polisomi-ergosomi), care la unele specii (Bacillus cereus, Bacillus megaterium) vin în

contact direct cu sistemul membranar (unit membrana).

Rolul ribozomilor este esențial în procesul de proteinosinteză. La nivelul lor are loc traducerea informației genetice adusă de la ADN de ARN mesager. ARN mesager se fixează pe poliribozomi și asigură secvenționalizarea specifică a acizilor aminici în lanțul polipeptidic. Eficiența proteinosintetică a poliribozomilor este mult mai mare decît a ribozomilor izolați. Subunitățile 30 S interacționează cu codonii ARN mesager și anticodonii ARN transportor, contribuind la legarea directă a ARN mesager și ARN transportor de ribozom. Subunitățile 50 S conțin situsurile enzimatice responsabile de formarea lanțurilor polipeptidice.

b) Vacuolele

Vacuolele sînt organite citoplasmatice care apar în număr variabil (6-20) în perioada de creștere activă a celulei bacteriene. Inițial apar sub forma unor mici cavități săpate în citoplasmă și care se măresc progresiv, împingînd uneori conținutul citoplasmatic spre periferia sau polii celulei.

La microscopul electronic apar sub forma unor corpusculi rotunzi, cu diametrul de 300-500 Å delimitați de un înveliș lipoproteic unistratificat, gros de 30 Å, numit tonoplast.

La bacterii întîlnim două tipuri de vacuole:

- vacuole cu suc celular ce conțin diferite substanțe minerale și organice solvite, sau care conțin picături lipidice;
- vacuole cu gaz, (întîlnite la bacteriile fotosintetizante, la *Halobacterium* sp., și la cyanobacterii) care conțin probabil azot rezultat din metabolism sau provenit din aer. Sînt întîlnite, în special, la microorganisme acvatice, imobile.

Totalitatea vacuolelor din celulă constituie vacuomul.

Semnificația biologică a vacuolelor este încă discutată. Se admite că ele sînt originea substanțelor de rezervă, intervin în menținerea echilibrului acido-bazic, prin soluțiile tampon ce le conțin și acumulează produși toxici de metabolism ce trebuiesc excretați în mediu.

Vacuolele cu gaz pot fi considerate ca organite de flotație. La bacteriile aerobe (*Halobacterium sp.*) și la cyanobacterii ele asigură ridicarea la suprafață a celulelor. La bacteriile anaerobe (bacteriile sulfuroase fotosintetizante, purpurii și verzi) ele contribuie la formarea unei pături orizontale subțiri, în zona anaerobă din profunzimea mărilor, oceanelor sau lacurilor. Prezența vacuolelor cu gaz explică și unele fenomene naturale dăunătoare, cum ar fi de exemplu înflorirea apelor. Acest fenomen constă în acumularea, la suprafața mărilor sau lacurilor, a unor enorme cantități de cyanobacterii, a căror multiplicare este favorizată de unele condiții locale.

Mecanismul de formare a vacuolelor a fost explicat de KNAYSI (1951). După acest autor, în celula bacteriană, în timpul fazei de creștere activă, se acumulează cantități mari de apă. La un moment dat, excesul de apă se separă sub formă de picături, în care se dizolvă produșii de metabolism solubili și electroliții. Lipidele fiind substanțe active de suprafață, în combinație cu proteinele citoplasmatice, se acumulează la suprafața acestor picături formînd tonoplastul.

3.2.1.7. Incluziunile citoplasmatice

Incluziunile sînt substanțe inerte depuse în citoplasma celulei, îndeplinind rol de substanțe de rezervă.

După natura lor sînt de mai multe feluri:

a) Incluziuni de polimeri organici. Din această categorie fac parte: incluziunile polizaharidice (glicogen și amidon) și cele de acid poli - β - hidroxibutiric. Dacă incluziunile de glicogen și amidon le întîlnim și la eucariote, cele de acid poli-β-hidroxibutiric sînt specifice numai procariotelor, la care nu întîlnim incluziuni de grăsimi neutre.

De regulă generală, la o specie dată, se formează numai un anumit tip de incluziuni. De exemplu, la speciile genului *Clostridium* (anaerob) întîlnim, ca substanțe de rezervă, incluziunile de glicogen sau amidon. La specii aerobe de *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Spirillum* se formează numai

incluziuni de acid-poli-β-hidroxibutiric. Totuşi, unele specii pot să-şi sintetizeze ambele tipuri de incluziuni, proprietate caracteristică bacteriilor purpurii.

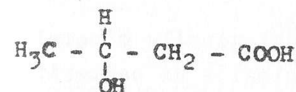
Incluziunile polizaharidice pot fi depistate numai la microscopul electronic. La microscopul fotonic, ele pot fi observate numai după o prealabilă tratare a celulelor cu I în IK. In aceste condiţii, incluziunile de glicogen se colorează în brun-roşcat, iar cele de amidon în albastru închis. Incluziunile de acid poli-β-hidroxibutiric se observă uşor datorită gradului lor mare de refringenţă, sau pot fi puse în evidenţă după o colorare specifică pentru grăsimi (Sudan III).

In stadiul de creştere activă a celulelor, incluziunile citoplasmatice nu apar în număr mare, dar ele se acumulează masiv în condiţiile în care sursa de azot din mediu este limitată iar celulele mai dispun încă de o sursă de energie. In aceste circumstanţe, cînd este împiedicată sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor, cea mai mare parte a carbonului asimilat de celulele bacteriene se depune ca substanţe de rezervă. Acestea pot ajunge pînă la 50% din greutatea uscată a celulei. Dacă astfel de celule sînt apoi introduse într-un mediu lipsit de sursă de carbon, dar care conţine o sursă convenabilă de azot (exemplu săruri de amoniu), ele îşi pot sintetiza acizii nucleici şi proteinele utilizînd substanţele de rezervă.

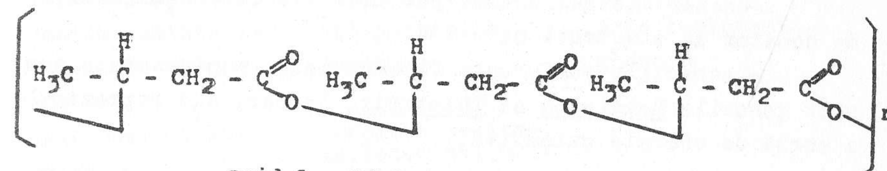
Formarea incluziunilor de polimeri organici reprezintă o cale de acumulare a carbonului sub formă osmotic inactivă, iar sinteza poli-β-hidroxibutiratului este un mijloc de neutralizare a unui metabolit acid. Grupul carboxilic liber al acidului β-hidroxibutiric este blocat prin formarea legăturii esterice între subunităţile polimerului.(Fig.16).

b) Incluziunile de polimeri minerali sau de volutină

Descoperite de VICTOR BABES (1887) la *Corynebacterium diphteriae* şi *Mycobacterium tuberculosis*, şi apoi de ERNST (1889) la alte bacterii, aceste incluziuni se prezintă sub forma unor granule colorabile cu coloranţi bazici. Se numesc granulaţii sau incluziuni de volutină (GRIMM 19o2) deoarece se întîlnesc în număr foarte mare la *Spirillum volutans*.



acidul beta-hidroxibutiric



acidul poli-beta-hidroxibutiric.

Fig.nr.16.

Fig.nr.16.

VICTOR BABES le-a descris ca granule sau corpusculi metacromatici deoarece cu albastru de metilena se colorează în purpuriu (efect matacromatic). Acest efect se datoreşte prezenţei unei cantităţi mari de polifosfaţi minerali. Polifosfaţii sînt polimeri lineari de ortofosfaţi, cu lanţul mai scurt sau mai lung.

Incluziunile de volutină sînt mai frecvente la bacteriile Gram pozitive. Ele au aspectul unor granulaţii sferice cu diametrul de la cîteva sute de Å pînă la 0,5 nm, şi se formează în condiţii de carenţe nutritive. Carenţa în sulfaţi favorizează acumularea rapidă şi masivă a polifosfaţilor. Dacă celulelor care au acumulat cantităţi mari de polifosfaţi, li se adaugă în mediu sulfaţi, atunci se constată dispariţia rapidă a polifosfaţilor. Cercetările făcute cu P^{32} au arătat că o parte din P^{32} al polifosfaţilor este reîntîlnit în acizii nucleici. De aici s-a tras concluzia că incluziunile de volutină constituie o rezervă intracelulară de fosfaţi, formată în condiţii în care sinteza acizilor nucleici este împiedicată.

c)Incluziunile minerale(de sulf).Incluziunile minerale de sulf sînt întîlnite la două grupe fiziologice de bacterii sulfuroase:

-bacteriile sulfuroase purpurii, la care H_2S joacă rol de donator de electroni şi

-bacteriile sulfuroase filamentoase, nepigmentate,cum sînt genurile Beggiatoa şi Thiothrix, la care H_2S reprezintă o sursă de energie oxidativă.

Incluziunile de sulf mineral se prezintă sub forma unor corpusculi birefringenţi. La ambele grupe de bacterii, acumularea sulfului sub formă de incluziuni este tranzitorie şi se realizează numai cînd mediul conţine suficient H_2S. Cînd H_2S din mediu diminuiază sau dispare, sulful din incluziunile citoplasmatice este oxidat în sulfaţi.

3.2.2. ELEMENTE STRUCTURALE INCONSTANTE

3.2.2.1. Capsula şi stratul mucos

Unele bacterii şi cyanobacterii secretă, la suprafaţa celulei, substanţe mucoase sau gumoase. Cînd aceste substanţe se dispun compact, în jurul corpului celular, ele formează capsula. Dacă rămîn puţin ataşate de celulă şi formează o pătură mai mult sau mai puţin difuză, ele constituie stratul mucos.

Capsula şi stratul mucos pot fi puse în evidenţă la microscopul fotonic cu ajutorul tuşului de China (coloraţie negativă). La microscopul electronic nu sînt observabile deoarece conţin polizaharide transparente la electroni. Aceste formaţiuni extraparietale nu prezintă nici o structură şi au o grosime ce variază de la 0,5 la 2μ .

Capsula este întîlnită la specii ca: Bacillus anthracis, Diplococcus pneumoniae, Leuconostoc mesenteroides, Streptococcus salivarius, Aerobacter aerogenes, ş.a.

In general, atît capsula cît şi stratul mucos sînt constituite din polizaharide, polipeptide sau polizaharide şi complexe proteice.(Tabel nr.4).

Tabel nr.4

Compoziţia chimică a capsulei la unele bacterii

Specia	Natura capsulei	Subunităţile chimice
Bacillus anthracis	Polipeptidică	acid D-glutamic
Leuconostoc mesenteroides	Dextran	glucoză
Diplococcus pneumoniae	Complexe polizaharidice(mai multe tipuri).	
	Tip II	ramnoză,glucoză, acid glucuronic.
	Tip.III	glucoză,acid glucuronic.
	Tip VI	galactoză,glucoză, ramnoză.
	Tip XIV	galactoză,glucoză, N-acetilglucozamină
	Tip CVIII	ramnoză,glucoză
Streptococcus sp.	Acid hialuronic	N-acetilglucozamină, acid glucuronic
Streptococcus salivarius	Levan	fructoză
Acetobacter xylinum	Celuloză	glucoză
Aerobacter aerogenes	Complex polizaharidic	glucoză,fucoză, acid glucuronic.

Capacitatea de a forma capsulă este o proprietate ereditară a unei specii dar, capsula nu este o componentă structurală esenţială şi constantă a celulei, deoarece o specie capsulată poate prezenta tulpini mutante necapsulate,care se dezvoltă normal. Pe de altă parte, celulele capsulate îşi pot pierde capsula, prin hidroliza enzimatică a substanţelor capsulare, rămînînd viabile.

Capsulogeneza este favorizată de anumite medii de cultură. Astfel, Leuconostoc mesenteroides formează dextranii capsulari numai în medii cu zaharoză iar la Bacillus anthracis constituirea capsulei este favorizată de adăugarea în mediu a cazeinei sau a serului sanguin.

Deşi capsula nu este un element structural esenţial, ea are, probabil, un rol ecologic în supravieţuirea bacteriilor în natură. Exemplul cel mai edificator îl constituie pneumococul (Diplococcus pneumoniae). Tulpinile capsulate de pneumococ sînt patogene deoarece celulele capsulate nu sînt fagocitate, în timp ce tulpinele necapsulate sînt lipsite de patogenetitate (sînt fagocitabile). La bacteriile din sol sau pe, capsula reprezintă un mijloc de apărare eficace împotriva predatorilor(protozoare).

3.2.2.2. Flagelii sau cilii

Există bacterii mobile, a căror capacitate de deplasare se datorează prezenţei unor organite speciale de mişcare, numite flageli sau cili, Flagelii se întîlnesc, în special, la bacili şi spirili, mai rar la coci. Numărul şi poziţia lor sînt caracteristici de specie şi prezintă valoare taxonomică.

La bacteriile ciliate, în general, întîlnim 1-30 cili. Ei pot fi dispuşi polar sau pe toată suprafaţa celulei.Funcţie de modul de dispunere a cililor, bacteriile ciliate pot fi:

a)Monotriche - cu un singur cil polar.(Ex.Vibrio cholerae, Pseudomonas spinosa, Pseudomonas diminuta, ş.a.).

b)Amfitriche - cu cîte un cil la ambii poli ai celulei (Ex.Bacillus megaterium).

c)Lefotriche - cu un smoc de cili la un pol al celulei sau cu smocuri la ambii poli.(Ex.Pseudomonas cyanogenes, Spirillum marinus).

d)Peritriche - cu cilii pe toată suprafaţa celulei. (Ex.Proteus vulgaris, Rhizobium leguminosarum,etc.)(Fig.17).

Cilii sînt formaţi dintr-un filament cu o lungime ce variază de la cîţiva microni pînă la de 10 ori lungimea celulei de care sînt ataşaţi. Diametrul lor este de 120-185 Å, dar la unele specii (Vibrio cholerae) acesta poate fi mai mare (350 Å).

Cilii prezintă pe toată lungimea lor ondulaţii regulate, cu lungimea ondulelor şi a distanţelor dintre ele riguros determinate. Ei pot fi observaţi la microscopul fotonic numai după coloraţii speciale, sau la microscopul electronic.

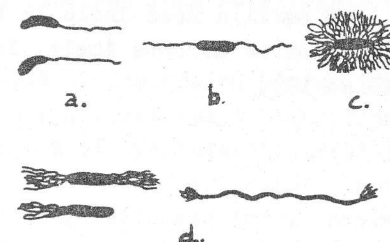


Fig.nr.17. Bacterii ciliate.
a:monotriche; b:amfitriche;
c:peritriche; d:lofotriche.

Filamentul flagelar este constituit dintr-o proteină caracteristică, numită "flagelină" care, în urma unor tratamente (pH 3-4, detergenţi, temperatură la 60°C) se depolimerizează în subunităţi proteice solubile, cu greutate moleculară de 30.000-40.000. Aceste proteine sînt sărace în acizi aminici aromatici şi cu sulf, dar bogate în acid aspartic şi acid glutamic.

Flagelina cililor unei tulpini bacteriene este constituită dintr-un singur tip de subunităţi, fapt care explică înalta specificitate antigenică a acestor proteine flagelare. Subunităţile proteice flagelare, readuse la temperatura de 30°C şi la un pH neutru, se autoasamblează fără intervenţia vreunui sistem enzimatic sau a unei surse de energie. Totuşi, această autopolimerizare nu este posibilă decît în prezenţa unor mici fragmente de flagili. Fragmentele de flagili au un aspect asimetric, cu o extremitate convexă iar cealaltă prezentînd o creastă. Fixarea noilor subunităţi se face numai la, extremitatea cu creastă. Acest fenomen ilustrează principiul autoasamblării spontane a unei structuri din subunităţi identice, principiu de mare importanţă în formarea structurilor biologice.

Cilii se fixează de celula bacteriană printr-un croşet cu diametrul ceva mai mare decît filamentul flagelar şi care, probabil, este format dintr-o altă proteină decît flagelina.

Acest croşet se ataşează de peretele celular şi membrana citoplasmatică prin două serii a două inele la bacteriile Gram negative şi numai o serie de două inele, la bacteriile Gram pozitive.(Fig.18 şi 19).

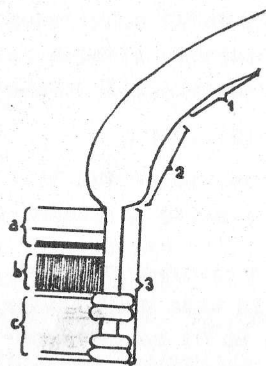


Fig.18.Structura flagelului la Spirillum serpens. 1:filament;2:croşet; 3:corpuscul(croşet)bazal. a:perete celular;b:membrana citoplasmatică;c:membrana polară.

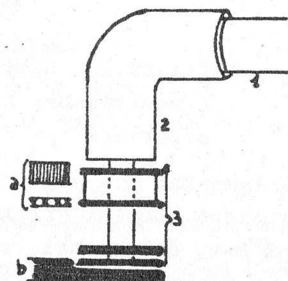


Fig.19.Structura flagelului la Escherichia coli. 1:filament;2:croşet;3:corpuscul(croşet)bazal. a:perete celular;b:membrana citoplasmatică.

Cercetările privind dezvoltarea cililor, in vivo, au arătat că ei cresc prin partea lor distală, ceea ce înseamnă că subunităţile proteice se fixează la extremitatea flagelului, confirmîndu-se astfel cercetările efectuate in vitro. Modul în care subunităţile proteice ajung din celulă în regiunea distală a flagelului nu se cunoaşte încă. Se pare că ele străbat un canal central al filamentului, dar pînă în prezent existenţa acestui canal nu a putut fi demonstrată.

Mecanismul contracţiei cililor şi al deplasării celulelor bacteriene este încă la nivelul ipotezelor.Se pare că este vorba de un mecanism asemănător celui al contracţiei musculare, energia fiind furnizată de ATP. Bacteriile aerobe regenerează ATP numai în prezenţa oxigenului iar cele anaerobe prin degradarea argininei în ornitină şi transformarea ADP

în ATP. Această ipoteză încă nu a primit o confirmare experimentală.

In legătură cu deplasarea bacteriilor, cert pare să fie faptul că, prezenţa peretelui celular rigid este indispensabilă; protoplaştii şi sferoplaştii, deşi îşi păstrează cilii, nu sînt mobili. Viteza de deplasare a bacteriilor, raportată la dimensiunile celulei, este foarte mare dar variabilă funcţie de numărul şi poziţia cililor. Distanţa parcursă într-o secundă poate fi de 10-15 pînă la 100 de ori lungimea bacteriei. Escherichia coli se deplasează cu 28 μ /sec (10 cm/h), Spirillum volutans cu 63 μ/sec, Vibrio cholerae cu 55 μ/sec. Astfel de viteze de deplasare nu mai sînt întîlnite în lumea vie.

In suspensii, mişcarea bacteriilor ciliate este continuă dar haotică. Dacă o astfel de suspensie bacteriană este supusă influenţei unor factori fizici sau chimici care prezintă un gradient de intensitate sau concentraţie, atunci se observă că celulele se deplasează orientat şi se acumulează în zona în care gradientul asigură condiţii optime de viaţă. Acest fenomen este cunoscut sub denumirea generică de tactism. Dacă factorul este o substanţă chimică (o sursă de energie, oxigenul, etc.) vorbim de chemotactism. Chemotactismul determinat de oxigen se mai numeşte aerotactism. Dacă factorul este luminat atunci e vorba de fototactism, întîlnit, în special,la bacteriile fotosintetizante ciliate. Fototactismul, dar în deosebi chemotactismul pot fi şi negative în sensul îndepărtării celulelor de o concentraţie, sau o intensitate luminoasă,nocive.

Tactismul bacteriilor ciliate, în condiţii naturale, prezintă importanţă ecologică, deoarece datorită lui celulele bacteriene pot ocoli condiţiile nefavorabile de mediu. Modul în care bacteriile îşi coordonează şi controlează mişcările cililor în funcţie de gradientul factorilor de mediu, nu este cunoscut.

La vibrioni şi spirochete întîlnim un tip deosebit de flageli. Astfel la Vibrio şi la Bdelovibrio(bacterii Gram ne-

gative) cilii sînt acoperiţi de o teacă care pare să fie o continuare a învelişului extern al peretelui celular. La spirochete nu întîlnim flageli tipici ci corpul lor este înfăşurat în jurul unui filament axial, format din mai multe fibre fixate de ambele capete ale celulei. (Fig.2o). Cînd fibrele se con-

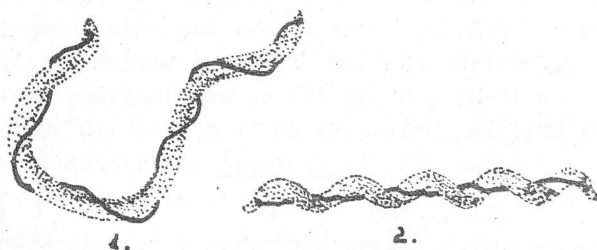


Fig.nr.2o.Spirochetă în repaus(1) şi în contracţie (2).

tractă, celula flexibilă ia aspectul unei forme helicale. Mişcarea este asigurată de alternanţa dintre contracţiile şi relaxările filamentului axial care determină micşorarea şi mărirea spirelor helixului celular. Mişcarea spirochetelor este asemănătoare cu a şarpelui.

Unele bacterii sînt mobile dar nu posedă cili. Ele prezintă o motilitate prin glisare (alunecare) şi se pot deplasa numai în contact cu o suprafaţă solidă. Motilitatea prin glisare este întîlnită la myxobacterii, unele bacterii filamentoase şi de asemenea la unele cyanobacterii. In ce priveşte mecanismul mişcării prin glisare se pare că e vorba de un anumit tip de interacţiune între celulă şi suprafaţa solidă, deoarece mişcarea dispare dacă bacteriile respective sînt introduse într-un mediu lichid. Interesant este că şi la aceste bacterii întîlnim fenomenul de tactism.

3.2.2.3. Pilii

Pilii sau fimbriile sînt apendici filiformi, prezenţi la unele bacterii, în special la enterobacterii şi la alte bacterii Gram negative. La bacteriile Gram pozitive încă nu au

fost descrişi. Prezenţa pililor este determinată genetic dar pierderea pililor, prin mutaţie, nu afectează viabilitatea celulelor.

Pilii sînt formaţiuni filamentoase rigide, casante, mult mai subţiri dar mult mai nueroşi decît flagelii. Numărul lor variază de la unu pînă la cîteva sute, pentru o celulă. Ei pot fi observaţi numai la microscopul electronic. Prin agitarea puternică a unei culturi bacteriene, pilii pot fi cu uşurinţă detaşaţi de pe celule.

Analizele chimice ale preparatelor de pili purificate, au arătat că sînt formaţi dintr-o proteină "pilină", care prin tratare cu acid se depolimerizează în subunităţi cu greutate moleculară de 17.000. In mediul neutru şi la rece, aceste subunităţi se autoasamblează într-o structură identică cu pilii originali.

Structura moleculară a pililor este destul de complexă. Sînt formaţi dintr-o fibră spiralată helical, groasă de circa 70 Å , străbătută de un canal central cu diametrul de aproximativ 25 Å.

Există mai multe tipuri de pili, notaţi cu cifre romane de la I la V. La enterobacteriacee a fost descris un al şaselea tip, pilul F sau de sex. Pilii de tip F joacă un rol esenţial în conjugarea bacteriană. Ei sînt prezenţi numai la celulele cu caractere de "masculi" (donatoare). Numărul lor este de 1-2 pentru o celulă. Dacă prin diferite procedee pilii F sînt detaşaţi de pe celulele "mascule" iar acestea sînt puse în contact cu celule receptoare, "femele", acuplarea şi conjugarea nu mai are loc. Este posibil că ei să aibă rol şi în recunoaşterea celulelor "femele". In timpul conjugării, prin pilii F are loc transferul fragmentului de ADN de la celula donatoare la cea receptoare. Trecerea ADN prin canalul central al pililor este posibilă deoarece acesta are un diametru ceva mai mare decît diametrul moleculei de ADN.

Pilii F servesc şi ca receptori pentru fixarea unor bacteriofagi. Aceştia se fixează la extremitatea pililor şi îşi introduc genomul lor, în celula bacteriană, prin canalul central.

Pilii de tip I, se pare că asigură celulelor un avantaj biologic față de celulele nepiliate (P^-), în sensul că le conferă posibilitatea să se dezvolte mai bine în medii cu concentrații scăzute de O_2 și în condiții în care densitatea celulelor este maximă. Probabil că au rol de organite de transport pentru unii metaboliți. De asemenea, ei ar asigura fixar a bacteriilor pe diferite substraturi organice,iar la suprafața mediilor lichide ar favoriza aglomerarea în masă a celulelor, sub forma unei pelicule.

3.2.2.4. Cromatoforii

Cromatoforii sînt organite citoplasmatice, întîlnite la bacteriile fotosintetizante purpurii (Rhodospirillum rubrum). Ei conțin totalitatea bacterioclorofilei, pigmenții carotenoizi, proteine, polihazaride, fosofolipide, citocromi și o cantitate relativ mare de fier neheminic, acidosolubil.

După NEWTON (1957) și FULLER (1963) fiecare cromatofor ar conține circa 200 molecule de bacterioclorofilă într-un raport cu carotenoizii și citocromii de 10 : 5 : 1.

Cercetări electronomicroscopice au arătat că cromatoforii au o formă veziculară sau lamelară și sînt în contact direct cu membrana citoplasmatică, din care derivă făcînd parte din "unit membrană". Aceste formațiuni au fost denumite cromatofori de SCHACHMAN, PARDEE și STANIER (1952), iar ulterior tylakoizi (MENKE 1962). Numărul cromatoforilor este în raport invers proporțional cu intensitatea luminii și direct proporțional cu cantitatea de bacterioclorofilă.

La bacteriile fotosintetizante verzi(Chlorobium)aparatul fotosintetic este total diferit. Celulele conțin un număr destul de mare de vezicule alungite, numite "veziculele de la Chlorobium", cu dimensiuni de 300 x 1000 Å, dispuse în citoplasma periferică, aproape de membrana citoplasmatică, dar fără a fi în contact cu ea. Fiecare veziculă prezintă o membrană proprie foarte fină, unistratificată, care nu face parte din "unit membrană". Intreaga cantitate de bacterioclorofilă este localizată în aceste vezicule. Bacteriile fotosintetizante verzi sînt singurele organisme fototrofe la care

aparatul fotosintetic nu este legat de sistemul membranar tipic (unit membrana).

Cromatoforii au rol esențial în fotosinteză.

3.2.2.5. Sporul bacterian

La unele specii bacteriene, forma vegetativă(de creștere și multiplicare) se poate transforma într-un spor.Aceste bacterii se numesc sporogene.

Sporul bacterian este o formațiune intracelulară,metabolic inactivă, refringentă, dotată cu calități deosebite de rezistență la temperatură, radiații, substanțe chimice și care conservă, în stare latentă, timp îndelungat, toate proprietățile genotipice și fenotipice ale celulei vegetative din care provine.

Sporul este întîlnit, în special, la specii din familia Bacillaceae; constant la genul Clostridium(anaerob) și facultativ de genul Bacillus(aerob). La coci este întîlnit numai excepțional (Sporosarcina ureae).

La bacterii sînt cunoscute patru tipuri diferite de spori:

a)Endosporul sau sporul propriu zis. Este o formațiune intracelulară foarte refringentă și rezistentă la factorii nefavorabili din mediu. Celula bacteriană care formează astfel de spor se numește sporangiu.

b)Artrosporul, o formațiune intracelulară cu o mai mică rezistență decît a endosporului, dar superioară formei vegetative. Se formează prin fragmentarea celulei vegetative. A fost descris la Bacillus megaterium și Bacillus zopfii.

c)Chlamidosporul sau microchistul, întîlnit la Azotobacter chroococcum. Rezultă din îngroșarea peretelui celulei vegetative și acumularea unor substanțe de rezervă. Celula astfel transformată devine mai rezistentă la condițiile de mediu fără a avea însă toate particularitățile sporului propriu zis.

d)Gonidia. Este o formațiune intracelulară sferică,

rezultată din condesarea și fragmentarea conținutului celular. De regulă apar mai multe gonidii mici care, după ruperea peretelui celulei în care se formează (gonidangiu) se eliberează în mediu. Nu are calități specifice sporului dar are, în schimb, rol în înmulțire. A fost descrisă la Leptothrix ochracea.

Morfologia sporului

Indiferent de morfologia celulei în care se constituie (coc sau bacil) forma sporului (endosporului) este rotundă sau ovală. Dimensiunile sporilor, variabile după specie sau în cadrul aceleiași specii funcție de vîrstă și condițiile de mediu, sînt cuprinse între 0,2 și 2 μ.

Poziția sporului în celula bacteriană este diferită și reprezintă un criteriu de identificare și clasificare a speciilor. Astfel, sporul ocupă o poziție centrală la Bacillus anthracis, subterminală la Bacillus cereus și Bacillus asterosporus, sau o poziție terminală la Clostridium tetani(Fig.21).

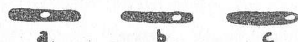


Fig.nr.21.Spori nedeformanți
a:central; b:subterminal;c:terminal

Diametrul sporului poate fi mai mare decît diametrul transversal al celulei în care se formează, în care caz deformează celula. Sporii deformanți îi întîlnim la bacili telurici, anaerobi, Gram pozitivi, patogeni sau saprofiți, aparținînd genului Clostridium. Datorită acestui fapt speciile cu sporul central au aspectul de fus(Clostridium pasteurianum), de rachetă de tenis, cînd sporul este subterminal (Clostridium sporogenes)sau de băț de tobă dacă sporul este terminal (Clostridium tetani).(Fig.22).



Fig.nr.22.Spori deformanți.a:central; b:subterminal; c:terminal.

La marea majoritate a speciilor sporulate, sporul este unic și numai excepțional s-au descris mai mulți spori în aceiași celulă bacteriană (Metanobacterium polyspora,Bacillus bütschlii), dar această situație se datorează unei nesincronizări între procesul de diviziune celulară și cel de formare a sporului.

La microscopul fotonic sporii apar ca formațiuni refringente, distincte, incolore, deoarece nu sînt permiabili la coloranții uzuali. Pot fi însă colorați prin metode speciale, după permiabilizarea învelișurilor sporale la cald.

Structura sporului

In general, structura sporului este, cu unele mici variații, aceiași la toate bacteriile. Microscopia electronică a pus în evidență următoarele elemente structurale:

a)Tunicile(învelișurile)sporale, reprezentînd trei straturi suprapuse: un strat extern - exina, unul intern - intina, între care se găsește stratul mijlociu. Aceste straturi electronoopace reprezintă 20-30% din greutatea uscată a sporului și conțin 80% din proteinele sporale.

b)Cortexul - este o zonă electronotransparentă situată sub tunica internă sporală și reprezintă 10-20% din greutatea uscată a sporului. Conține o substanță specifică - acidul dipicolinic, responsabil de termorezistența sporilor.

c)Membrana sporoplasmei. Este, de fapt, membrana citoplasmatică a celulei vegetative.

d)Sporoplasma sau inima sporului. Reprezintă 60-70% din greutatea uscată a sporului și conține elementele biologic active. In ea se disting ribozomii și nucleoplasma.ADN sporal reprezintă 32-54%, în medie 50%, din cantitatea existentă în celula vegetativă de origine. Se mai găsește ARN ribozomal dar lipsește ARN medager. Raportul ADN/ARN variază între 1,9 și 4,5.

In afară de aceste elemente structurale, la unele specii(Bacillus cereus,Bacillus anthracis),la suprafața

tunicelor sporale se găseşte un strat extern, mucos, de formă neregulată, numit exosporium. Natura chimică şi funcţiile acestei formaţiuni încă nu se cunosc.

Sporii unor bacterii (<u>Clostridium botulinum,Bacillus circulans</u>, ş.a.) prezintă la suprafaţă nişte apendici tubulari sau sub forma unor pene de pasăre, izolaţi sau grupaţi în smocuri, localizaţi la unul sau la ambii poli ai celulei.

Structura sporului poate fi urmărită în fig.nr.23.

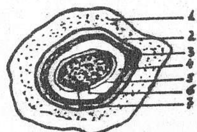


Fig.nr.23.Structura sporului bacterian. 1:citoplasmă;2:exină;3:strat mijlociu; 4:intină;5:cortex;6:membrana sporoplasmei;7:sporoplasma.

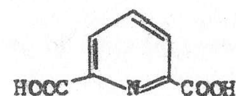
<u>Compoziţia chimică a sporului</u>

Sporul conţine, în general, aceiaşi componenţi chimici ca şi celula vegetativă, dar în raporturi diferite. Sporul este mai bogat în Ca^{++} şi Mg^{++} şi mai sărac în K^{+} şi fosfor. Caracteristic sporului este prezenţa acidului dipicolibic, sub formă de dipicolinat de Ca (Fig.24) care conferă termorezistenţa. Sporul este mai sărac în enzime decît celula vegetativă iar enzimele existente sînt inactive. Din această cauză sporul este metabolic inactiv.

<u>Sporogeneza</u>

Sporogeneza reprezintă un proces de morfogeneză,prin care în interiorul unei celule bacteriene se diferenţiază o altă celulă diferită din punct de vedere chimic, enzimatic şi fiziologic.

Sporogeneza comportă şase stadii:



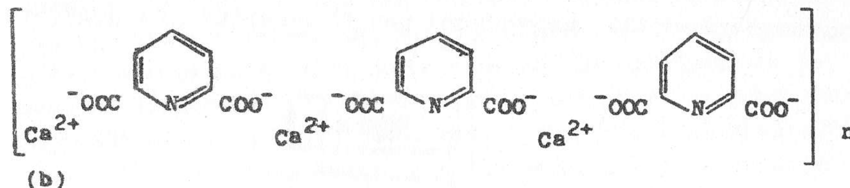


Fig.nr.24.Structura acidului dipicolinic(a) şi a complexului calciu-acid dipicolinic(b).

-<u>Stadiul I</u> începe în urma unei diviziuni nucleare dar care nu este urmată de diviziunea celulei. Elementele nucleare rezultate din diviziune se contopesc apoi formînd un singur filament cromatic axial.

-<u>Stadiul II</u>. Membrana citoplasmatică se invaginează inelar închizîndu-se ca o diafragmă şi formează septul sporal. Acest sept sporal se deosebeşte de septul de diviziune prin poziţia sa care nu este centrală ci deplasată spre un pol,iar mureina parietală nu participă la formarea sa.

-<u>Stadiul III</u>. Septul sporal se alungeşte circumscriind o zonă din citoplasmă pe care o închide complet spre unul din polii celulei. Acesta este stadiul de <u>prespor</u>. Presporul este delimitat de o membrană dublă dar rămîne inclus în citoplasma celulei mamă (sporangelui).

-<u>Stadiul IV</u>. Intre cele două foiţe ale membranei presporului, se depune un peptidoglican, formînd o zonă clară cu structură lamelară, sau cortexul. Acest peptidoglican nu este identic cu mureina peretelui celular. La sfîrşitul stadiului IV, pe partea internă a cortexului, se diferenţiază un perete celular primordial sau viitorul perete al celulei care va rezulta din germinarea sporului.

-Stadiul V, este caracterizat de apariţia tunicilor sporale: intina şi exina. Ele se formează din proteine bogate în glicină tirozină şi cistină.

-Stadiul VI. Se sintetizează acidul dipicolinic şi se acumulează cantităţi mari de Ca^{++}, apare refringenţa şi rezistenţa sporului la căldură şi agenţii chimici. Sporul este acum matur şi ulterior este pus în libertate prin liza celulei sporange. Stadiile sporogenezei pot fi urmărite în fig.25.

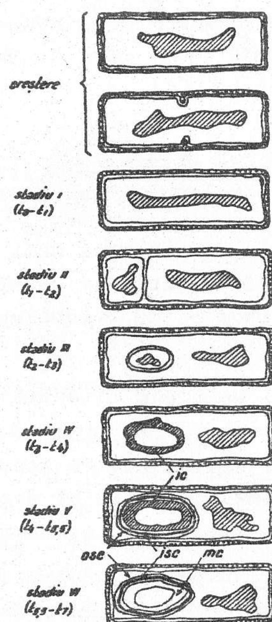


Fig.nr.25.Sporogeneza la Bacillus subtilis.

Liza sporangelui este produsă de enzime care se sintetizează în cursul sporogenezei.

Sporogeneza este un fenomen ce prezintă multe similitudini cu diviziunea celulară de care se deosebeşte prin aceia că cele două celule rezultate au o evoluţie total diferită: una formează sporul iar cealaltă (sporangele)lizează.

Durata sporogenezei variază foarte mult în funcţie de specie şi factorii de mediu. La Bacillus subtilis, la 37°C, în medii aerate, sporogeneza durează 6 ore iar la Bacillus cereus 6,5 - 8,00 ore.

In raport cu celula vegetativă,sporul conţine structuri chimice şi antigenice proprii dar şi structuri comune. Apariţia, în spor, a unor compuşi noi, cum este acidul dipicolinic, presupune intervenţia, în sporogeneză, a unor gene care în celula vegetativă sînt nefuncţionale. Se presupune că în celulele bacteriilor sporulate există două grupe de gene: unele răspunzătoare de sinteza structurilor vegetative şi altele de structurile sporale. Starea de nefuncţionare a genelor structurilor sporale în celula vegetativă şi a genelor structurilor vegetative în spor se datoreşte unor represori. Cercetările efectuate pe Bacillus subtils tulpina Marburg,(SCHAEFFER P et al. 1963, 1965) au arătat că la sfîrşitul fazei de multiplicare logaritmică şi a epuizării mediului în anumite substanţe nutritive, moment notat arbitrar t_o, majoritatea celulelor încep să formeze spori. Sporul este complet format după 6 ore şi 1/2, respectiv la timpul $t_{6,5}$, cînd 60% dintre celule sînt sporulate. Dacă la timpul t_o se adaugă mediului glucoză multiplicarea continuă iar la $t_{6,5}$ numai 1% din celule sînt sporulate. Aceasta înseamnă că glucoza adăugată mediului represează genele structurale sporale şi în consecinţă sporul nu se mai formează. Atunci cînd glucoza se adaugă mediului nu la timpul t_o ci cu 1/2 oră mai tîrziu, adică la $t_{o,5}$, efectul ei represor nu se mai produce. Inseamnă că în 30 minute, în celulele apte de sporulare s-au produs deja modificări ireversibile şi fenomenul de sporulare nu mai poate fi oprit.

La alte specii, glucoza îşi exercită efectul represor numai în asociere cu o sursă de azot metabolizabilă.

Sporogeneza apare, prin urmare, ca un fenomen de tip "totul sau nimic". Bacilii aerobi nu sporulează în absenţa O_2 iar cei anaerobi (Clostridium) în aerobioză. Prezenţa unor elemente chimice ca Mg^{++}, Zn^{++}, Mn^{++}, K^{+}este indispensabilă sporogenezei. Ele au o acţiune activatoare asupra unor sisteme enzimatice.

Sporogeneza este însoţită şi de unele modificări biochimice. Astfel unele substanţe care se sintetizau în celula vegetativă nu se mai sintetizează în celula pe cale de sporulare, în schimb, în aceasta din urmă apar structuri noi (acidul dipicolinic). Pe de altă parte, celulele intrate în sporogeneză pot continua formarea sporului chiar dacă sînt introd se în apă distilată, ceea ce dovedeşte că sursele de energie i de substanţe plastice, necesare constituirii sporului, sînt asigurate de celulă. Aceasta presupune că sporogeneza este precedată de acumularea în celulă a unor substanţe de rezervă ce vor fi utilizate apoi în sporogeneză. Energia necesară sporogenezei poate fi utilizate apoi în sporogeneză.Energia necesară sporogenezei poate fi asigurată de:

-oxidarea polizaharidelor sau lipidelor de rezervă;

-oxidarea acizilor cu C_2 şi C_3 acumulaţi în mediu în timpul creşterii, la bacteriile la care polizaharidele şi lipidele nu se depun ca substanţe de rezervă;

-oxidarea unor acizi aminici eliberaţi în urma metabolismului proteic.

Toate aceste oxidări precum şi sinteza ATP legată de elem sînt posibile la t_0 datorită intensificării activităţii unor enzime din ciclul Krebs, care numai în acest moment devin funcţionale şi a unor transportori de electroni,ca NADH-oxidaza.

In cursul sporogenezei, la unele bacterii aerobe sau anaerobe, se eliberează în mediu substanţe biologic active: enzime, antibiotice, toxine. Astfel <u>Bacillus subtilis</u> eliberează amilaze şi proteaze, <u>Bacillus cereus</u> amilaze, etc. Fenomenul este deosebit de important pentru industria microbiologică, tulpinile respective fiind utilizate în producerea industrială a acestor enzime. De asemenea, unele tulpini bacteriene produc, în timpul formării sporului, antibiotice peptidice, iar la specia <u>Clostridium hystoliticum</u> s-a evidenţiat existenţa unei relaţii între sporogeneză şi secreţia de toxină.

<u>Germinarea sporului</u>

Fenomenul de transformare a sporului în celulă vegetativă, respectiv trecerea sporului din starea dormantă,metabolic inactivă,la starea metabolic activă, se numeşte germinare.

Germinarea sporului se realizează în trei faze:activarea, iniţierea germinării şi creşterea postgerminală.

a)<u>Activarea</u>, este un proces reversibil şi nu întotdeauna obligatoriu. Ea, în general, nu este însoţită de modificări morfologice decelabile. Ca agenţi activatori pot interveni: căldura, umiditatea, pH şi unele substanţe chimice. Natura şi mecanismul activării sînt foarte puţin cunoscute. Se presupune că activarea ar permite sporului să răspundă la stimulii de germinare şi ar consta în schimbarea unor structuri moleculare de suprafaţă. In această acţiune apa liberă, în deosebi sub formă de vapori, ar juca un rol principal.

b)<u>Initierea germinării</u> urmează fazei de activare şi se caracterizează prin apariţia unor modificări morfologice. In cursul acestei faze sporul îşi măreşte volumul cu 20%,îşi pierde refringenţa, iar cortexul şi tunicile sporale se tumefiază. Paralel, sporul îşi pierde termorezistenţa deoarece, dipicolinatul de Ca şi unii produşi de hidroliză ai peptidoglicanului din cortex, se elimină în mediu.

Iniţierea germinării este determinată genetic dar, trecerea factorilor iniţierii din stare inactivă în stare de funcţionalitate este condiţionată de mediu. Iniţierea este realizată, obişnuit, în medii lichide, între anumite limite de temperatură şi în prezenţa unor inductori chimici.

Mecanismul iniţierii germinării probabil că se explică prin teoria ţintei unice. Fiecare iniţiator (inductor) al germinării reprezintă substratul unei enzime de pe suprafaţa sporului. Iniţiatorul acţionează asupra unui punct de pe suprafaţa sporului (locul unde se află enzima respectivă),punct care reprezintă ţinta sa. Odată ţinta atinsă, iniţiatorul este descompus eliberînd energia necesară celorlalte procese ce caracterizează germinarea.

c)<u>Creşterea postgerminală</u>. Intre faza de iniţiere şi cea de creştere nu există diferenţieri nete, dar dacă iniţierea germinării ... ate realiza fără un aport exogen de energie,

creşterea necesită prezenţa unor substanţe nutritive,deoarece încep procese de sinteză complexe şi active. Creşterea postgerminală se sfîrşeşte în momentul cînd celula vegetativă rezultată intră în prima diviziune.

Dezintegrarea structurilor sporale începută în faza de iniţiere se accentuează şi se desăvîrşeşte în faza de creştere. Astfel, cortexul şi tunicile sporale dispar, iar celula vegetativă se constituie în centrul sporului unde devin vizibili ribozomii şi materialul nuclear (cromozomul). Pe măsură ce celula vegetativă se constituie ea devine mai mare, se alungeşte şi herniază din spor. Uneori, celula vegetativă poartă ataşate de ea, la unul sau la ambii poli, resturi din învelişurile sporale.

Creşterea postgerminală este însoţită de modificări de ordin molecular. Apare ARN mesager şi începe sinteza proteinelor. Se sintetizează, de asemenea, enzimele care iniţiază, la rîndul lor, sinteza acidului teicoic.

Semnificaţia biologică a sporului bacterian. Sporul reprezintă o etapă normală a ciclului de dezvoltare a bacteriilor sporogene, deoarece sporogeneza necesită condiţii de mediu similare celor reclamate de celula vegetativă, uneori cu limite de variaţie mult mai mici. El se deosebeşte de celula vegetativă prin mai multe caractere (tabel nr.5) şi se comportă ca o formă de rezistenţă ce păstrează intacte toate caracterele genotipice şi fenotipice ale speciei.

Tabel nr.5

Deosebirile dintre sporul bacterian şi celula vegetativă

Caracterul	Celula vegetativă	Spor
1	2	3
Structură	Tipică celulelor Gram pozitive.	Cortex,tunicile sporale şi exosporium(la unele specii)
Aspect microscopic	Nerefringent	Refringent

1	2	3
Compoziţie chimică:		
Calciu	scăzut	crescut
Acid dipicolinic	absent	prezent
Poli-hridroxibutirat	prezent	absent
Polizaharide	multe	puţine
Proteine	puţine	multe
Acizi aminici cu sulf	puţini	predominanţi
Activitate enzimatică	înaltă	slabă
Metabolism	înalt	slab sau absent
Sinteza macromoleculelor	prezentă	absentă
ARN-mesager	prezent	puţin sau absent
Rezistenţă termică	scăzută	înaltă
Rezistenţă la radiaţii	scăzută	înaltă
Rezistenţă la acizi şi agenţi chimici	scăzută	înaltă
Colorabilitate	colorabilă	colorabil numai prin metode speciale
Acţiunea lizozimului	sensibilă	rezistent.

Sporul bacterian nu reprezintă o formă de multiplicare ca la fungi.

Rezistenţa sporului bacterian la factorii nefavorabili din mediu este deosebit de mare. Sporii unor bacterii rezistă cîteva ore la 12o°C căldură umedă, sau la 2oo°C căldură uscată. S-au găsit spori viabili şi după mai bine de 100 de ani(Bacillus anthracis). Există date în literatură care atestă viabilitatea sporilor după cîteva sute de ani sau chiar din epoca cuaternară.

3.3. Compoziţia chimică a bacteriilor

Celula bacteriană are, în general, o compoziţie chimică asemănătoare cu cea a celorlalte organisme, dar aceasta variază în funcţie de compoziţia mediului şi vîrsta celulelor.

Principalele elemente chimice care intră în compoziţia celulelor bacteriene sînt prezentate în tabelul nr.6

Tabel nr.6

Elementele chimice principale din celula bacteriană

Elementul	% din greutatea uscată a celulei
Carbon	50
Oxigen	20
Azot	14
Hidrogen	8
Fosfor	3
Sulf	1
Potasiu	1
Sodiu	1
Calciu	0,5
Magneziu	0,5
Clor	0,5
Fier	0,2
Alte elemente	0,3

Pe lîngă acestea, unele elemente chimice ca Co, Cu, Mn, Zn, Mo ş.a. se găsesc în celula bacteriană numai ca urme şi se numesc elemente urmă sau oligoelemente.

Elementele minerale au, în general, rol plastic, formînd substanţele celulare (apa, sărurile minerale, glucide, lipide, proteine), sau îndeplinesc funcţii de activare a unor sisteme enzimatice (oligoelementele).

Compoziţia chimică a celulei bacteriene este controlată genetic, dar acest caracter este doar calitativ, în sensul că se referă numai la tipul de substanţe nu şi la concentraţia lor. Din punct de vedere cantitativ, diferitele substanţe celulare pot să difere foarte mult, la diferitele tulpini ale aceleiaşi specii, sau chiar la aceeaşi tulpină în funcţie de mediul de cultură. Rezultă că celula bacteriană prezintă o mare plasticitate chimică, o pronunţată capacitate de adaptare la mediu prin modificarea compoziţiei chimice în raport de compoziţia mediului în care cresc şi se multiplică. In

cursul acestui proces, celula bacteriană îşi modifică raportul dintre substanţe dar nu şi substanţele însăşi.

3.3.1. Apa

Apa este cel mai important constituient al celulei bacteriene. Cantitativ ea reprezintă 70-85% din greutatea celulei vegetative.

In celula bacteriană apa se găseşte sub două forme:apă liberă şi apă legată de diferitele componente celulare(coloizi).

Rolul fiziologic pe care îl deţine apa este esenţial, deoarece ea constituie mediul în care se dizolvă majoritatea componentelor celulare şi în care au loc toate reacţiile metabolismului intermediar. Metabolismul normal şi activitatea tuturor sistemelor enzimatice care îl catalizează, creşterea şi multiplicarea bacteriilor, sînt posibile numai în prezenţa apei.

3.3.2. Substanţele minerale

Substanţele minerale reprezintă 2-20% din greutatea uscată a celulelor. In celulele tinere concentraţia elementelor minerale este de 6-7 ori mai mare decît în celulele bătrîne.

Rolul fiziologic al principalelor elemente chimice şi al oligoelementelor este sintetizat în tabelul nr.7.

Tabel nr.7

Funcţiile fiziologice generale ale principalelor elemente chimice şi aleoligoelementelor.

Elementul	Rolul fiziologic
1	2
Hidrogenul	Constituient al apei şi al substanţelor organice din celulă.
Oxigenul	Constituient al apei şi al substanţelor organice din celulă. Ca O_2 acceptor de electroni în respiraţia aerobă.
Carbonul	Constituient al substabţelor organice celulare.
Azotul	Constituient al proteinelor,acizilor nucleici şi coenzimelor.

1	2
Sulful	Constituient al proteinelor(al acizilor aminici cu sulf)şi al unor coenzime(CoA,cocarboxilaza).
Fosforul	Constituient al acizilor nucleici, fosfolipidelor şi al unor coenzime.
Potasiul	Principal cation mineral în celulă; cofactor pentru unele enzime.
Magneziul	Cation celular important;cofactor pentru foarte multe reacţii enzimatice;constituient al clorofilei.
Manganul	Cofactor mineral pentru unele enzime, uneori înlocuind magneziul.
Calciul	Cation celular important;cofactor pentru unele enzime(proteaze).
Fierul	Constituient al citocromilor şi al altor proteine heminice sau neheminice; cofactor pentru un număr de enzime.
Cobaltul	Constituient al vit.B_{12}
Cuprul,Zincul,Molibdenul.	Constituienţi minerali ai unor enzime speciale.

Sintetizînd, se poate conchide că, prezenţa substanţelor minerale, sub formă de săruri, este necesară în celulă, pentru:

-menţinerea echilibrului acido-bazic şi a potenţialului oxido-reducător;

-reglarea presiunii osmotice şi menţinerea echilibrului de membrană;

-sinteza unor constituienţi celulari(rol plastic);

-activarea unor sisteme enzimatice.

Compoziţia minerală a celulelor bacteriene determină şi comportamentul lor faţă de sărurile din mediu. Din acest punct de vedere, bacteriile pot fi grupate în: nehalofile, adică bacterii care necesită pentru dezvoltarea lor mai puţin de 2% NaCl şi bacterii halofile, cu necesităţi în NaCl mai mari de 2%.

Bacteriile nehalofile,la rîndul lor,pot fi:

-sensibile: necesită < 2% NaCl şi

-tolerante: suportă şi cantităţi mai mari de 2% NaCl

Bacteriile halofile pot fi:

-facultative: cresc pe medii cu 2% NaCl dar preferă cantităţi mai mari;

-obligate: se dezvoltă numai pe medii cu concentraţii mai mari de 2% NaCl. Acestea pot fi: moderate (necesită sub 15% NaCl) şi extreme (au nevoie de NaCl în concentraţie de 15-20%).

Dintre bacteriile halofile fac parte specii din familia Pseudomonadaceae, bacteriile sulfato-reducătoare şi altele. Toate se caracterizează prin dimensiuni mici şi prin sinteza unor pigmenţi carotenoizi de culoare galbenă sau roşie.

3.3.3. Substanţele organice

3.3.3.1. A.D.N.

Celula bacteriană conţine ADN localizat în cromozom, sub forma unei singure molecule circulare, gigant, dublu helicală, cu greutate moleculară de circa 10^9 daltoni (0,4 x 10^9 la Mycoplasma şi 2,8 x 10^9 la Escherichia coli).

Cantitatea de ADN din celula bacteriană reprezintă 2-5% din greutatea uscată a celulei; ea este de 1000 de ori mai mică decît cea conţinută într-o celulă de mamifer şi de 1000 de ori mai mare decît cea dintr-un virion. In orice caz, cantitatea de ADN din celulă este o constantă biologică. Cantitatea fixă de ADN limitează numărul proteinelor şi a moleculelor mai mici care pot fi sintetizate de o celulă.

Conţinutul în baze purinice şi pirimidinice a ADN bacterian variază, funcţie de grupul taxonomic, de la 30-75% moli guanină (G) + citozină (C) şi 25-70% adenină (A) şi timină(T). Raportul A + T/G + C este caracteristic pentru fiecare specie bacteriană şi are valoare taxonomică.

ADN îndeplineşte un rol genetic esenţial.

3.3.3.2. A.R.N.

ARN reprezintă 17% din greutatea uscată a celulei bacteriene. Are localizare citoplasmatică şi se găseşte sub trei

forme diferite, atît ca mărime a moleculei cît şi ca rol funcţional, determinat de secvenţa bazelor din structura să.

ARN-mesager reprezintă 1% din cantitatea totală de ARN şi este heterogen prezentînd circa 1000 tipuri diferite. Îndeplineşte funcţia de transmitere a informaţiei genetice, în proteinosinteză, de la gene la ribozomi. Are o viaţă scurtă fiind degradat în 1-2 minute după sinteză ceea ce înseamnă că într-o singură generaţie o celulă bacteriană sintetizează 12.500-25.000 molecule.

ARN-transportor sau solubil, este, de asemenea, de mai multe tipuri diferite, 1-4 tipuri pentru un aminoacid. Are rol, de transportor şi adaptor al acizilor aminici pe matricea de ARN-m,în sinteza proteinelor.

ARN-ribozomal intră în structura ribozomilor dar rolul lui încă nu este suficient cunoscut.

3.3.3.3. Proteinele

Proteinele bacteriene, holoproteine şi heteroproteide, reprezintă, în medie, 60% (12-85%) din greutatea uscată a celulelor. Ele constituie circa un milion de molecule de diferite tipuri (2000-3000).

Conţinutul proteic total al bacteriilor nu variază în funcţie de starea fiziologică a celulei deoarece el este menţinut constant datorită pe de o parte mecanismelor de reglare metabolică, iar pe de altă parte stabilităţii lor. Natura proteinelor bacteriene este însă foarte diferită. Circa 50% din proteine au rol plastic-structural iar cealaltă jumătate îndeplinesc funcţii enzimatice.

3.3.3.4. Lipidele.

Conţinutul celulelor bacteriene în lipide este foarte variabil, funcţie de specie, vîrsta celulei şi mediul de cultură. Ele reprezintă 1-20% din greutatea uscată a bacteriilor dar, la Mycobacterium pot ajunge pînă la 40%. Natura constituienţilor lipidici extraşi din bacterii, este foarte diferită: gliceride, fosfatide, ceruri. Cu excepţia mycoplasmelor, la bacterii nu întîlnim colesterol.

Lipidele sînt localizate în membrana citoplasmatică şi sub formă de picături intracitoplasmtice. Cele intraplasmatice reprezintă substanţe de rezervă cu nivel energetic ridicat. Totuşi, acumularea lor în celulă pare să fie un simptom de degenerescenţă.

Incluziunile lipidice intracitoplasmatice sînt reprezentate de poli - β -hidroxibutirat, care poate fi folosit ca sursă de energie şi carbon, prin descompunere anaerobă în β--hidroxibutirat şi acetoacetat, metaboliţi ce pot fi apoi oxidaţi în CO_2 şi H_2O.

La Mycobacterium o parte din lipidele celulare se găsesc sub formă de ceruri (micol).

3.3.3.5. Glucidele

Glucidele reprezintă 4-25% din greutatea uscată a bacteriilor. Ele pot fi simple (mono şi dizaharide) sau complexe (polizaharide) ca pentozani, hexozani sau polimeri micşti.

Polizaharidele pot fi endocelulare constituind substanţe de rezervă (incluziunile de glicogen şi amidon) şi exocelulare, cum sînt dextranii sau glucozanii excretaţi de Leuconostoc mesenteroides, sau fructozanii de la Bacillus subtilis, Streptococcus salivarius, Aerobacter levanicum, etc.

Acumularea polizaharidelor în jurul celulei bacteriene are loc atunci cînd în mediul de cultură sursa de azot s-a epuizat dar mai există cantităţi suficiente din sursa de carbon.

Bacteriile nu conţin celuloză. In mod excepţional, la Acetobacter xylinum, în prezenţa zaharozei şi glicerolului, se formează, la suprafaţa peretelui celular, fibre de celuloză care dau coloniilor aspect pîslos.

Unele polizaharide heterogene (polimeri micşti)în special mucopolizaharide au un rol important în determinarea specificităţii antigenice şi ca factori de virulenţă. Aşa sînt heteropolizaharidele capsulare la pneumococ şi la pneumobacilul Fridländer.

3.3.3.6. Enzimele bacteriene

Bacteriile posedă un echipament enzimatic foarte complex şi activ, datorită căruia ele desfăşoară, în natură, o activitate extraordinară pentru realizarea circuitului substanţelor. Elementele chimice biogene ca N,C,P,S, şi altele, parcurg la suprafaţa planetei noastre circuite caracteristice, care nu s-ar putea realiza sau nu ar fi complete, dacă nu ar interveni activitatea enzimatică a microorganismelor, a bacteriilor în primul rînd.

Enzimele bacteriene prezintă caracterele generale ale tuturor enzimelor;

-sînt eficiente în cantităţi extrem de mici;
-se găsesc neschimbate la sfîrşitul reacţiei;
-nu afectează echilibrul reacţiei chimice;
-au mare specificitate de reacţie;

Din punct de vedere al structurii chimice, enzimele bacteriene sînt fie proteine simple (holoproteice), fie proteine conjugate (heteroproteice). Enzimele din această ultimă grupă sînt formate dintr-o holoproteină, numită apoenzimă,care determină specificitatea reacţiei enzimatice şi un grup prostetic, numit coenzimă, reprezentat de un compus termostabil, organic sau anorganic.Coenzima are rolul de a activa substratul asupra căruia va acţiona apoenzima.

Enzimele holoproteice sau apoenzimele, în cazul celor heteroproteice, posedă o anumită secvenţionalizare a acizilor aminici care constituie centrul sau situsul activ. Acesta poartă răspunderea acţiunii catalitice.

Reacţia enzimatică se caracterizează prin formarea unui complex substrat (S)-enzimă(E), care apoi se scindează în enzimă (E) şi produşii de reacţie (A,B,C...)conform schemei:



$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + A + B + C \ldots\ldots$$

Activitatea enzimelor este foarte mult influenţată de factorii de mediu (temperatură, pH), de concentraţia substratului precum şi de prezenţa sau absenţa inhibitorilor enzimatici. Fiecare enzimă are o anumită temperatură optimă de ac-

tivitate şi de asemenea, un pH optim. De remarcat că, în general, temperatura optimă de activitate a enzimelor este ceva mai mare decît temperatura optimă de creştere şi multiplicare a bacteriilor.

Inhibitorii enzimatici sînt factori fizici sau chimici care denaturează proteinele enzimelor ori blochează elementele componente ale enzimei sau a unor radicali ai acizilor aminici din molecula proteinei enzimă. Aceşti inhibitori pot fi necompetitivi (săruri ale metalelor grele, cianuri, acid tanic, acid tricloracetic, acid fosfotungstic) şi competitivi.

Inhibitorii competitivi, numiţi şi antimetaboliţi, sînt substanţe cu structuri spaţiale identice cu aceia a substratului enzimei. Datorită acestui fapt ei sînt capabili să intre în competiţie cu substratul fixîndu-se pe enzimă(situsul activ) ireversibil. Ei blochează astfel situsul activ iar substratul rămîne netransformat. Reacţia enzimatică nu se mai produce după schema de mai sus ci are loc astfel: $X + E \rightleftharpoons (E.X)$.
Spre exemplu, dehidrogenaza succinică este inhibată competitiv de acidul malonic ($COOH-CH_2-COOH$) care posedă grupări polare spaţiale identice cu cele ale acidului succinic ($COOH-CH_2-CH_2-COOH$), substratul enzimei în cauză.

Inhibitorii competitivi sau antimetaboliţii se pot opune multiplicării bacteriilor intrînd în competiţie cu un metabolit esenţial, indispensabil dezvoltării bacteriene.Bacteria pierde astfel posibilitatea de a sintetiza proprii săi constituienţi. Acest fenomen, de mare importanţă practică în terapeutica bolilor infecţioase, explică acţiunea bacteriostatică a unor medicamente (sulfamide, antibiotice, ş.a.).

Funcţie de raportul lor cu celula bacteriană, care le produce, enzimele pot fi:

a)exoenzime - sau enzime elaborate de celula bacteriană dar eliminate în afara celulei, unde acţionează transformînd diferite substrate în molecule mici care pot traversa barierele celulei. Acestea sînt hidrolaze ca: proteaze, amilaze, celulaze;

b)<u>endoenzime</u> - sau enzime intracelulare. Acestea pot fi:

-enzime solubile, localizate la suprafaţa structurilor superficiale de unde pot fi uşor eliberate prin intervenţia unor factori mecanici sau fizici (sfărîmare, ultrasunete) şi

-enzime "particulate" legate de structuri celulare (membrana citoplasmatică , mezozomi, cromatofori).Aceste enzime realizează metabolismul energetic celular, iar la bacteriile fotosintetizante, procesul de fotosinteză.

Mecanismul prin care celula bacteriană elimină în mediu exoenzimele este încă la nivel de ipoteze. Se crede că ele se formează la nivelul poliribozomilor din imediata vecinătate a membranei citoplasmatice sau chiar la nivelul membranei de unde difuzează, prin peretele celular, la exterior, fără să fi existat în stare liberă în citoplasmă.

Echipamentul enzimatic al bacteriilor este determinat genetic. Numărul enzimelor sintetizat de o celulă este identic cu numărul determinanţilor genetici din genomul său. Acesta la <u>Escherichia coli</u> este de circa 2000.

Desfăşurarea metabolismului bacterian în concordanţă cu necesităţile celulei este posibilă datorită faptului că celula bacteriană posedă mecanisme de reglare care, în permanenţă, determină intrarea în activitate ori sistează activitatea unui anumit set de enzime, sau ajustează cantitatea relativă din fiecare enzimă, în raport cu nevoile de moment ale celulei şi ca răspuns la variaţiile mediului extern.

Aproape toate enzimele catabolice se sintetizează în celula bacteriană numai în prezenţa, în mediu, a substanţelor asupra cărora acţionează. Acestea sînt aşa numitele enzime adaptative sau induse. Substratul care induce sinteza lor poate fi o substanţă plastică sau energetică, sau din contra, o substanţă nocivă, a cărei descompunere enzimatică permite supravieţuirea celulei. De exemplu, penicilinaza este o enzimă indusă de prezenţa în mediu, a penicilinei.Descompunerea penicilinei de penicilinază determină supravieţuirea celulei la acţiunea acestui antibiotic(penicilinorezistenţa).

Alte enzime sînt sintetizate în celulă indiferent de compoziţia chimică a mediului de cultură. Acestea se numesc enzime constitutive şi ele sînt implicate, în special, în anabolism (enzime anabolice).

3.3.3.7. <u>Pigmenţii bacterieri</u>

Unele specii bacteriene au proprietatea de a produce pigmenţi divers coloraţi, Aceste specii se numesc cromogene.

Pigmenţii bacterieni sînt sintetizăţi în citoplasmă şi fie că rămîn în celulă, fie că sînt eliminaţi în mediu colorîndu-l. După localizarea pigmenţilor, în raport cu celula, bacteriile cromogene se pot împărţi în trei categorii:

a)<u>Bacterii cromofore</u>, la care pigmentul rămîne la locul de sinteză colorînd celula. De exemplu, bacteriile sulfuroase purpurii(Thiorhodobacteriile)care conţin bacteriopurpurină.

b)<u>Bacterii paracromofore.</u> Pigmentul sintetizat în citoplasmă se localizează în peretele celular sau în stratul mucos pericelular. In acest caz coloniile apar colorate.Exemple: <u>Staphylococcus aureus</u>, <u>Sarcina lutea</u>, etc.

c)<u>Bacterii cromopare</u>, la care pigmentul este eliminat în mediu care se colorează. Exemplu: <u>Pseudomonas aeruginosa</u>, care elimină în mediu un pigment albastru fluorescent.

După natura lor chimică, pigmenţii bacterieni pot fi clasificaţi în şase grupe:

1. <u>Derivaţi pirolici</u>: bacterioclorofila de la bacteriile fotosintetizante.

2. <u>Pigmenţi fenazinici</u>: pigmentul albastru de la <u>Pseudomonas aeruginosa</u>, format din fluoresceină(verde) şi piocianină (albastru); clorofila (verde) produs de <u>Bacillus clororaphis</u> şi iodinina (galben) produs de <u>Chromobacterium iodinum</u>.

3.<u>Pigmenţi carotenoizi</u>: zeaxantina, luteina, licopenul, etc., de culoare galbenă-portocalie sau roşie, întîlniţi la stafilococi, <u>Serratia marcescens</u>, micrococi, etc.

4. <u>Pigmenţi chinonici</u>, galbeni, înrudiţi cu vitamina K.Exemplu:ftiocolul de la <u>Mycobacterium tuberculosis.</u>

5. Pigmenţi melanici, de culoare neagră sau brună, întîlniţi, de exemplu, la Azotobacter chroococcum.

6. Pigmenţi antocianici, întîlniţi în special la specii de Streptomyces.

Pigmenţii bacterieni, după natura lor chimică, îndeplinesc roluri diferite. Unii (bacterioclorofilele) sînt implicaţi direct, sau indirect (pigmenţii carotenoizi), în fotosinteză. Alţii au rol protector, în special, împotriva radiaţiilor ultraviolete (pigmenţii carotenoizi de la bacteriile nefotosintetizante, prodigiozina de la Serratia marcescens. Există şi pigmenţi cu rol de vitamine (flavoproteina de la Lactobacillus delbrükii cu rol de vit.B_2, sau ftiocolul de la Mycobacterium tuberculosis cu funcţie de vit.K). In sfîrşit, unii pigmenţi au rol antibiotic (piocianina, violaceina, ftiocolul).

3.3.3.8. Vitaminele

Producerea unor vitamine de către bacterii a intrat deja în domeniul realizărilor industriale. Astfel vit.B_{12} este sintetizată exclusiv de microorganisme, în special de Streptomycetae (Streptomyces griseus, Streptomyces aureofaciens), Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis, Propionibacterium schermanni, diferite flavobacterii.

Unii bacili intestinali (Escherichia coli, Lactobacillus bifidus, Streptococcus faecalis, ş.a.) sintetizează importante cantităţi de vitamina K, iar alte specii, de asemenea din microflora intestinală, sintetizează vitamina B_6.

3.4. METABOLISMUL BACTERIAN

3.4.1. Consideraţii generale asupra fenomenelor energetice la bacterii

Celula bacteriană, deşi simplă ca structură, reprezintă un sistem complex şi organizat capabil să-şi sintetizeze propriile macromolecule plecînd de la monomeri cu greutate moleculară mică. Energia necesară sintezelor celulare este asigurată, la cele mai multe bacterii, de oxidarea enzimatică a substratului lor nutritiv.

Metabolismul bacterian poate fi deci definit ca totalitatea reacţiilor biochimice prin care energia şi substanţele biogene sînt luate din mediu şi utilizate pentru biosinteza componenţilor celulari şi creştere sau pentru alte activităţi vitale (mişcare, luminiscenţă, etc.).

Reacţiile biochimice specifice metabolismului se încadrează în două tipuri de căi metabolice. Reacţiile prin care se eliberează energia (exergonice) constituie catabolismul sau procesele de dezasimilaţie, iar reacţiile prin care se consumă energia (endergonice) corespund anabolismului sau proceselor de asimilaţie.

Creşterea celulei este rezultatul unei strînse interdependenţe dintre procesele catabolice şi anabolice, deoarece o parte din energia eliberată în urma catabolismului şi unii metaboliţi intermediari cu un număr variabil de atomi de carbon sînt utililizaţi în biosinteza macromoleculelor celulare.

In conformitate cu principiul II al termodinamicii, energia eliberată de un sistem (ΔH) nu este niciodată transformată în întregime într-un lucru mecanic ci o parte se pierde ducînd la creşterea entropiei. Energia liberă potenţială capabilă să se transforme în lucru mecanic (ΔF) este dată de reacţia: $\Delta H = \Delta F + T \Delta S$, în care $T \Delta S$ exprimă creşterea entropiei.

Celula bacteriană, ca orice alt sistem viu, se supune acestui principiu al termodinamicii şi în consecinţă ΔF va reprezenta energia liberă furnizată de reacţiile catabolice care, potenţial, poate fi utilizată în reacţiile celulare de biosinteză (anabolism). Dar, din cantitatea totală de energie eliberată de reacţiile biochimice catabolice numai o anumită parte, relativ mică, este utilizată în procesele de biosinteză. De exemplu în fermentaţia alcoolică, din conversia enzimatică a 1 mol de glucoză în 2 moli alcool etilic şi 2 moli CO_2 ($C_6H_{12}O_6 \rightleftharpoons 2C_2H_5OH + 2CO_2$) rezultă 56 kcal din care numai 16 sînt utilizate în biosinteză. Rezultă că eficienţa termodinamică a fermentaţiei alcoolice este de circa 29%, restul se pierde sub formă de căldură. Aceasta poate fi determinată valori-

metric şi constituie dovada ineficienţei termodinamice a legăturii dintre catabolism şi anabolism.

Pentru a înţelege însă cum o parte din energia liberă furnizată de reacţiile catabolice poate fi utilizată în procesele biosintetice trebuie să ţinem seama de natura legăturii chimice dintre cele două componente ale metabolismului.

Funcţia esenţială a tuturor reacţiilor catabolice eliberatoare de energie este formarea unor compuşi organici care includ o mare cantitate de energie potenţială sub formă de legături macroergice. Aceşti compuşi funcţionează ca purtători de energie (energy carriers) în sensul că energia lor potenţială poate fi utilizată, în reacţii cuplate, de variatele procese endergonice prin care se sintetizează materialul celular. Fiecare moleculă de compus macroergic conţine o cantitate fixă de energie potenţială. Principalii compuşi macroergici sînt: ATP şi nucleotidele piridinice reduse.

Structura chimică a ATP este redată de fig.26. ATP este

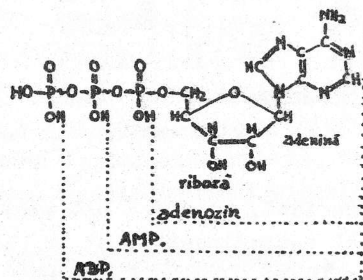


Fig.nr.26.Structura chimică a ATP.

un derivat al AMP sau acidului adenilic care adiţionează două grupări fosfatice prin legături pirofosforice. Aceste două legături sînt bogate în energie şi prin hidroliza ATP în ADP sau AMP este pusă în libertate. Fixarea sau eliberarea unei singure molecule de fosfat înseamnă înmagazinarea sau eliberarea a 8 kcal. Ţinînd seama că molecula de ATP posedă două astfel de legături înseamnă că potenţialul ei energetic este

de 16 kcal. Eliberarea energiei înmagazinate se face prin transferarea grupării fosforice terminale unei alte molecule sau metabolit, cu formare de ATP după schema:



Glucoză + ATP ⟶ Glucoză - 6 - fosfat + ADP.

Alte ori însă transferul de energie constă în cuplarea AMP de o moleculă acceptatoare şi eliberarea celor două grupări fosforice sub formă de pirofosfat mineral (P-P). Această reacţie o întîlnim, spre exemplu, la activarea acizilor aminici în procesul de proteinosinteză. Ea se petrece după schema:



Acid aminic + ATP ⟶ AMP-acid aminic + P-P.

Cînd în urma reacţiilor de transfer de energie se produce AMP el poate fi transformat enzimatic în ADP după schema:



AMP + ATP ⟶ 2 ADP.

In general însă, eliberarea şi utilizarea, în reacţii cuplate, a energiei incluse în legături fosforice ale ATP se fac prin conversia ATP în ADP. Dar, principala funcţie a metabolismului energetic este regenerarea stocului celular de ATP prin resinteză, plecînd de la ADP. Aceasta se poate realiza prin mecanisme biochimice diferite. De exemplu, în fermentaţia alcoolică şi alte fermentaţii regenerarea ATP se poate face în urma conversiei acidului 2-fosfogliceric în acid piruvic:

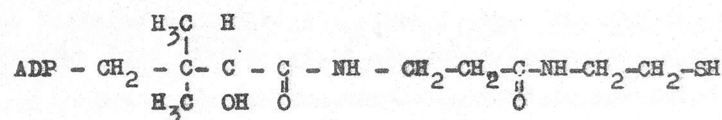


In această reacţie, legătura ester fosfat (-P) a acidului 2-fosfogliceric care are un conţinut energetic scăzut este transformată, printr-un rearanjament molecular, într-o legătură fosforică macroergică (∼ P) prin intermediul acidului fosfo-enolpiruvic care apoi cedează gruparea fosfat ADT rezultînd ATP.

Un alt tip de regenerare a ATP, comun unor fermentaţii

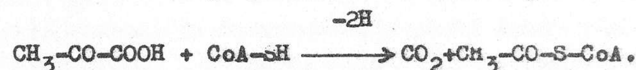
şi proceselor respiratorii, este reprezentat de oxidarea acizilor α-ceto (acid piruvic, acid α-cetoglutaric), prin intermediul coenzimei A.

Coenzima A derivă din ADP la a cărei grupare fosforică terminală se ataşează o moleculă de acid pantotenic cu o grupare tiolică (-SH) terminală:



Coenzima A (CoA-SH).

In oxidarea α-cetoacizilor coenzima A formează o legătură tioesterică cu gruparea carboxilică a produsului oxidat:



ac.piruvic Acetil coenzima A.

O parte din energia de oxidare este astfel conservată sub forma legăturii tioesterice dintre coenzima A şi produsul oxidat. Această energie poate ulterior să fie folosită la sinteza ATP din ADP şi fosfat mineral:



Acetil coenzima A. ac.acetic

Din cele de mai sus rezultă că ATP este compusul care face legătura dintre catabolism şi anabolism. Acest rol esenţial al ATP este schematic prezentat în fig.nr.27.

Procesele de biosinteză necesită o cantitate importantă de energie furnizată de substanţele macroergice, respectiv ATP. Pe lîngă aceasta ele reclamă, o sursă sau putere reducătoare care, de asemenea, rezultă din reacţiile catabolismului celular. Necesităţile în "putere reducătoare" sînt foarte variabile şi ele reflectă diferenţa dintre gradul de oxidare a substanţelor folosite în biosinteză şi a produşilor finali de biosinteză.

Transferul sursei sau puterei reducătoare de la căile

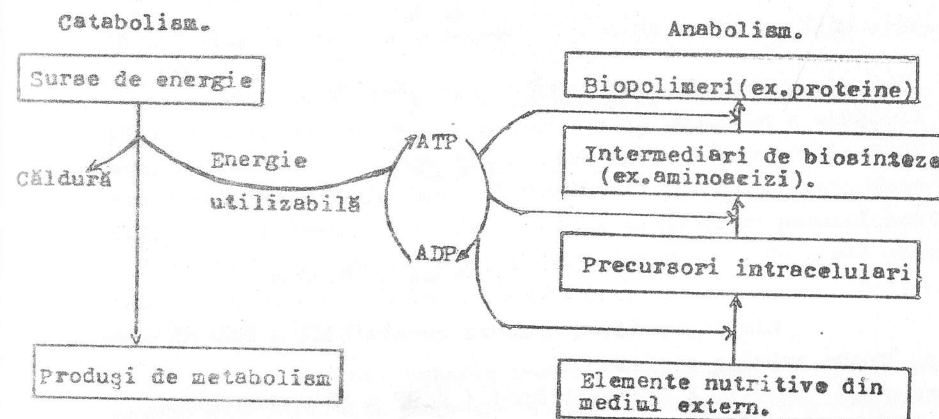


Fig.nr.27.Reprezentarea schematică a rolului ATP de cuplare a reacţiilor producătoare de energie cu cele de biosinteză.

furnizoare de energie la reacţiile reducătoare de biosinteză este mijlocit de două piridin nucleotide: nicotinamid-adenin-dinucleotidul (NAD) şi nicotinamid-adenin-dinucleotidul fosfat (NADP).

NAD este format din două nucleotide:acidul adenilic (AMP) şi nicotinamid ribotidul, legate între ele prin grupările fosforice(Fig.nr.28). Structura sa chimică poate fi exprimată ca nicotinamidriboză-P-P-riboză adenină.

NADP are o structură chimică identică dar conţine o grupare fosforică în plus legată de una din moleăulele reziduale de riboză.

Ambele piridin nucleotide pot fi reversibil oxidate şi reduse. Această oxido-reducere reversibilă se face la nivelul grupării nicotinamidice.

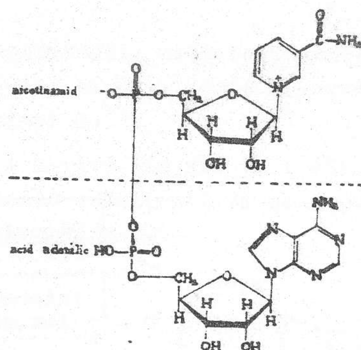


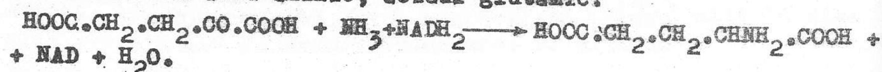
Fig.nr.28.Structura chimică a NAD.

Simplu, oxido-reducerea reversibilă a NAD şi NADP se poate exprima astfel:



$$NAD + 2\,H \rightleftharpoons NADH_2;\ NADP + 2H \rightleftharpoons NADPH_2$$

Reacţiile reductive de biosinteză sînt mediate de transferul de electroni de la formele reduse ale piridin nucleotidelor. De exemplu, aminarea reductivă a acidului α-cetoglutaric într-un acid aminic, acidul glutamic:



$$HOOC.CH_2.CH_2.CO.COOH + NH_3 + NADH_2 \longrightarrow HOOC.CH_2.CH_2.CHNH_2.COOH + NAD + H_2O.$$

In unele oxido-reduceri biologice intervine NAD, în altele NADP. Totuşi, din punct de vedere al metabolismului general, aceşti doi transporteri de electroni sînt echivalenţi, deoarece o enzimă specială transhidrogenaza, prezentă la unele microorganisme, poate mijloci transferul reversibil al electronilor conform schemei:



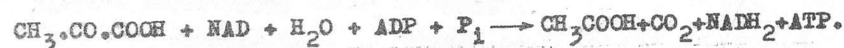
$$NADPH_2 + NAD \rightleftharpoons NADP + NADH_2$$

Un exemplu tipic de modul cum este generată "puterea reducătoare", îl reprezintă oxidarea etanolului în acetaldehidă, reacţie catalizată de alcooldehidrogenază:



$$CH_3.CH_2OH + NAD \longrightarrow CH_3.COH + NADH_2$$

Uneori reducerea piridin nucleotidelor duce, în special în reacţiile catabolice, la un cîştig de ATP. Exemplu oxidarea acidului piruvic în acid acetic:



$$CH_3.CO.COOH + NAD + H_2O + ADP + P_i \longrightarrow CH_3COOH + CO_2 + NADH_2 + ATP.$$

In metabolismul respirator, cea mai mare parte din piridin nucleotidele reduse, formate ca rezultat a oxidării compuşilor organici, vor genera ATP în urma reoxidării $NADH_2$ sau $NADPH_2$ prin transferul hidrogenului lanţului transportorilor de electroni, care în final îl cedează oxigenului. Această reoxidare a piridin nucleotidelor produce suficientă energie pentru a permite formarea, în condiţii optime, a trei molecule de ATP, din ADP.

Prin urmare, puterea reducătoare produsă de procesele metabolice furnizate de energie, sub formă de $NADH_2$ sau $NADPH_2$, poate fi utilizată în două moduri: pentru mijlocirea reacţiilor biosintetice reductive sau, în cazul metabolismului respirator, pentru producerea de ATP.

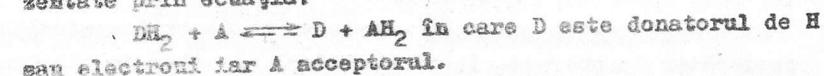
3.4.2. Eliberarea energiei la bacterii (Metabolismul energetic)

Eliberarea energiei în cursul proceselor catabolice se realizează prin reacţii de oxido-reducere.

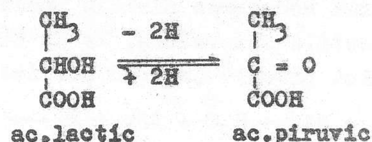
Oxido-reducerea biologică constă în pierderea a doi electroni, respectiv a doi atomi de H, din molecula unei substanţe numită donator şi transferul lor la molecula altei substanţe care are rol de acceptor. Substanţa care pierde H sau electroni se oxidează iar cea care îi acceptă se reduce. Aceste reacţii sînt cuplate şi reversibile, putînd fi reprezentate prin ecuaţia:

$DH_2 + A \rightleftharpoons D + AH_2$ în care D este donatorul de H sau electroni iar A acceptorul.

Datorită faptului că în cele mai multe reacţii de oxidare a compuşilor organici se pierd doi atomi de H acestea sînt de fapt reacţii de dehidrogenare. Reacţia inversă, de acceptare a atomilor de H, sau de reducere, este o reacţie de hidrogenare. Exemplu reacţia de oxidare a acidului lactic în



acid piruvic şi de reducere a acidului piruvic în acid lactic:



$$\begin{matrix} CH_3 & & CH_3 \\ | & -2H & | \\ CHOH & \rightleftharpoons & C=O \\ | & +2H & | \\ COOH & & COOH \\ \text{ac.lactic} & & \text{ac.piruvic} \end{matrix}$$

După natura acceptorului final de H, se cunosc trei tipuri de procese oxido-reductoare:

1.Fermentaţia - la care acceptorul final de H sau electroni este un compus organic (metabolit).

2.Respiraţia anaerobă -în care acceptorul final de H este o substanţă anorganică, cu excepţia oxigenului.

3.Respiraţia aerobă -cînd oxigenul este acceptor final de hidrogen.

Fermentaţia, reprezintă procesul metabolic producător de energie, în care compuşii organici servesc atît ca donatori cît şi ca acceptori de electroni. Aceşti compuşi sînt, de regulă doi metaboliţi rezultaţi din fermentarea substratului, din care unul oxidat iar celălalt redus.

Principalul substrat fermentascibil îl reprezintă hidraţii de carbon. Bacteriile însă pot fermenta şi alte clase de substanţe: acizi organici, acizi aminici, purine şi pirimidine. In timpul fermentaţiilor se formează o serie de metaboliţi care vor fi utilizaţi ca precursori în biosinteza materialului celular. Cea mai importantă sau chiar singura contribuţie energetică a fermentaţiilor este producerea de ATP. Acesta se formează prin transferarea grupărilor fosforice, de pe produşii intermediari fosforilaţi rezultaţi din descompunerea substratului, pe ADP.

Respiraţia anaerobă - este procesul oxido-reducător producător de energie, în care ultimul acceptor de electroni este un compus anorganic oxidat, altul decît O_2. Ca acceptori finali de electroni pot fi: sulfaţii, nitraţii şi carbonaţii. Respîraţia anaerobă o întîlnim la trei grupe de bacterii ale căror proprietăţi fiziologice şi biochimice sînt net diferite.

a)Bacteriile denitrificatoare. La acest grup de bacterii respiraţia anaerobă este cuplată cu reducerea nitraţilor. Denitrificarea permite un transfer global de 6 electroni pentru fiecare moleculă de acceptor final:

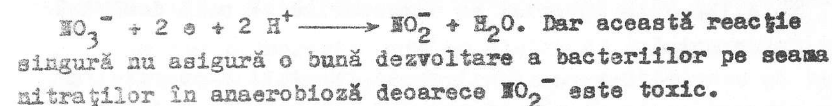


$$2\ NO_3^- + 12\ e + 12\ H^+ \longrightarrow N_2 + 6\ H_2O.$$

Produsul final este azotul gazos, uneori însoţit de un compus parţial redus, ca N_2O.

Prezenţa O_2 reprimă sinteza unei reductaze implicată în denitrificare. Acest tip de respiraţie este caracteristic pentru speciile denitrificatoare aparţinînd genurilor Pseudomonas şi Bacillus.

Respiraţia anaerobă cuplată cu denitrificarea poate fi însă facultativă la bacterii aerobe, la care lanţul respirator poate fi cuplat fie cu reducerea nitraţilor, fie cu O_2. Aceste bacterii conţin o nitrat -reductază care catalizează reacţia:



$NO_3^- + 2\ e + 2\ H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$. Dar această reacţie singură nu asigură o bună dezvoltare a bacteriilor pe seama nitraţilor în anaerobioză deoarece NO_2^- este toxic.

In general însă substanţele oxidabile în aerobioză de bacteriile denitrificatoare sînt în egală măsură oxidate şi în anaerobioză cînd nitraţii sînt acceptori finali de electroni. Oxidarea anaerobă a substanţelor organice este completă deoarece ciclul Krebs funcţionează ca şi în aerobioză. Există însă şi excepţii în sensul că unele specii (Pseudomonas aeruginosa) oxidează în aerobioză un substrat iar în anaerobioză alt substrat.

b).Bacteriile sulfatoreducătoare. Din acest grup fac parte genurile Desulfovibrio şi Desulfatomaculum, anaerobe stricte, la care respiraţia anaerobă este cuplată cu reducerea sulfaţilor, cu producere de H_2S:

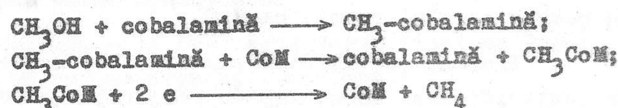


$$H_2SO_4 + 8\ e + 8\ H^+ \longrightarrow H_2S + 4\ H_2O$$

c)Bacteriile metanigene. Acestea folosesc ca acceptor final de H, CO_2. Sînt strict anaerobe iar reacţia globală este:



Ele au proprietatea de a oxida metanolul, care mai întîi este transmetilat, în prezența cobalaminei ca acceptor. Urmează o a doua transmetilare în care ca acceptor este coenzima M. Coenzima M metilată servește la rîndul ei ca substrat pentru formarea reductivă a metanului:



3. Respirația aerobă reprezintă totalitatea reacțiilor oxidoreducătoare producătoare de energie, în care un compus organic sau o substanță anorganică redusă joacă rol de donatori de electroni și în care acceptorul final de electroni este oxigenul molecular.

X

Toate reacțiile oxido-reducătoare celulare implicate în eliberarea energiei se caracterizează prin două trăsături fundamentale:

-eliberarea fracționată, treptată a energiei și

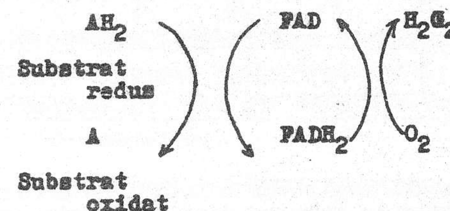
-stocarea surplusului de energie în vederea utilizării ei ulterioare.

Eliberarea fracționată a energiei este posibilă datorită faptului că respirația celulară se realizează prin oxidoreduceri succesive, catalizate de sisteme enzimatice care oxidează substratul dehidrogenîndu-l și transferă apoi atomii de H sistemului transportor de electroni; aceștia vor ceda electronii acceptorului final.

Respirația celulară debutează deci prin dehidrogenarea substratului (compus organic sau substanță minerală redusă) de către enzimele numite dehidrogenaze NAD sau NADP dependente. Piridin nucleotidele în acest caz au rol de coenzime pentru dehidrogenaze. Prin dehidrogenare substratul se oxidează iar NAD sau NADP acceptînd atomii de H, se reduc.

Există însă o altă categorie de dehidrogenaze, dehidrogenazele flavinice, a căror apoenzimă este strîns legată de

FMN (flavin-monénucleotid) sau FAD (flavin-adenin-dinucleotid), capabile să dehidrogeneze direct substratul cedînd apoi atomii de H direct oxigenului molecular, cu formare de H_2O_2. Peroxidul de hidrogen sub acțiunea peroxidazelor sau catalazelor va fi descompus în H_2O și O_2:



La bacteriile aerobe însă, aceste flavinenzime joacă rol de transportori de electroni interpuși între dehidrogenazele NAD sau NADP dependente și lanțul citocromic. Flavinenzimele reduse ($FADH_2$) cedează atomii de hidrogen ubiquinonei sau coenzimei Q oxidată care se reduce iar $FADH_2$ se preoxidează (FAD). Coenzima Q redusă va fi la rîndul ei oxidată, după prealabila disociere a atomilor de H în 2 electroni și 2 protoni, prin transferul electronilor lanțului citocromic.

Lanțul citocromic este un sistem de 3 citocromi: citocrom b, citocrom c și citpcrom a sau a_3, care primesc și transmit din unul în altul electronii, trecînd alternativ din stare exidată în stare redusă și invers.

Citocromii sînt enzime respiratorii cu un grup prostetic, hemul, în care Fe poate fi oxidat sau redus în mod reversibil, prin acceptarea sau pierderea electronilor.

Ultimul citocrom din lanț, citocromul a, transferă electronii citocromoxidazei (citocromul a_3) care în final îi cedează oxigenului molecular. Oxigenul molecular se reduce și se transformă în oxigen ionic (O^-) capabil să reacționeze cu protonii (H^+) din mediu pentru a forma molecula de H_2O.

Intreg procesul de respirație celulară poate fi schematizat astfel: (fig.nr.29).

De reținut este și faptul că sistemul citocromic complet este întîlnit numai la bacteriile strict aerobe

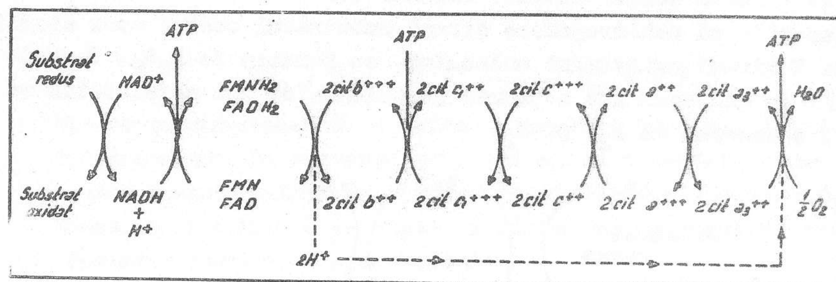


Fig.nr.29.Lanţul respirator cu oxidarea secvenţională şi punctele în care se degajă energia care va servi la sinteza ATP.

(Bacillus subtilis, ş.a.). La bacteriile facultative anaerobe întîlnim numai unul sau doi citocromi iar la cele anaerobe aceştia lipsesc.

Aceste reacţii succesive de oxido-reducere eliberează energia eşalonat. Surplusul de energie este stocat sub formă de ATP. Din schema de mai sus (fig.nr.29) rezultă că în urma oxidării substratului rezultă ATP în trei etape. Pentru fiecare pereche de H oxidaţi, sau altfel spus pentru fiecare moleculă de apă formată rezultă 3 moli de ATP.

ATP se formează în urma procesului de fosforilare oxidativă al cărui mecanism intim este încă puţin cunoscut. Dacă ţinem seama de faptul că formarea unui mol de ATP plecînd de la AMP înmagazinează 16 kcal, înseamnă că pentru fiecare moleculă de apă formată în procesele respiratorii rezultă 48 kcal. In realitate energia eliberată este de circa 55 kcal, restul de 7 kcal pierzîndu-se sub formă de căldură. Randamentul energetic este deci de 87%.

3.4.3. Comportamentul bacteriilor faţă de oxigenul molecular

Din acest punct de vedere bacteriile, şi în general toate microorganismele, pot fi grupate în patru tipuri respiratorii:

a) Microorganisme strict aerobe: Bacillus subtilis,

Bacillus anthracis, Azotobacter chroococcum, Mycobacterium tuberculosis, ş.a. Acestea necesită în permanenţă oxigen molecular în concentraţia atmosferică obişnuită (20-21%). Oxigenul reprezintă pentru ele unicul acceptor final de electroni.

b) Microorganisme aerobe, facultativ anaerobe: Streptococcus, Staphylococcus, Escherichia coli, ş.a. Obişnuit aerobe aceste microorganisme îşi pot adapta metabolismul şi la lipsa oxigenului (fermentaţie).

c) Microorganisme strict anaerobe: speciile genului Clostridium ş.a. care se dezvoltă numai în lipsa oxigenului molecular. Acestea sînt total lipsite de sistemul citocromic şi citocromoxidază. Pentru ele O_2 este toxic întrucît duce la formarea peroxidului de hidrogen: $AH_2 + O_2 \longrightarrow A + H_2O_2$, care nu se poate descompune în H_2O şi O_2 deoarece aceste bacterii sînt lipsite de peroxidaze şi catalaze. Unii autori explică acţiunea toxică a O_2 prin creşterea potenţialului oxido-reducător ceea ce afectează într-un mod ireversibil enzimele celulare sensibile la oxidare. Aşa s-ar explica de ce bacteriile anaerobe stricte pot fi cultivate în prezenţa O_2 cu condiţia ca potenţialul oxidoreducător al mediului să fie coborît prin adăugare de acid ascorbic, tioglicolat de sodiu, cisteină, etc.

d) Microorganisme microaerofile: Tiobacterii, spirochete, ş.a. care necesită pentru dezvoltare cantităţi reduse de O_2 (1%).

La bacteriile aerobe şi cele facultativ anaerobe consumul de O_2 este diferit în funcţie nu numai de tipul respirator ci şi de starea fiziologică a celulei precum şi de substratul folosit ca sursă de energie.

In tabelul nr.8 este redat consumul de O_2 la două specii de bacterii aerobe, facultativ anaerobe, funcţie de vîrsta celulelor şi substratul energetic, (M.D.Topală şi colab. 1966).

Tabel nr.8

Consumul de O_2 la Staphylococcus aureus şi Escherichia coli.(N.D.Topală şi colab.1966).

Specia	Vîrsta	Substratul	$O_2mm^3/h/mg$ N proteic
Staphylococcus aureus	18	apă distilată	17,515
" "	18	glucoză	1o2,400
" "	22	glucoză	106,430
" "	9	glucoză	198,150
" "	18	galactoză	74,095
" "	18	succinat	57,352
" "	18	inulină	37,083
Escherichia coli	18	apă distilată	59,298
" "	18	glucoză	88,738
" "	18	galactoză	60,443
" "	18	succinat	84,522
" "	18	inulină	60,995

3.4.4. Catabolismul

3.4.4.1. Pătrunderea substanţelor nutritive în celula bacteriană

Substanţele nutritive nu pot fi asimilate de bacterii decît după ce au pătruns în citoplasmă traversînd peretele celular şi membrana citoplasmatică. Dar cele mai multe dintre acestea sînt molecule mari şi cu greutate moleculară mare. Pentru a pătrunde în celulă ele trebuiesc, în prealabil, descompuse, "digerate", în molecule cu greutate moleculară mică. Această funcţie este îndeplinită de enzimele hidrolitice eliminate de bacterii în mediu (exoenzime). In urma hidrolizei rezultă molecule mici de peptide şi acizi aminici în cazul proteinelor,mono şi dizaharide în cazul hidraţilor de carbon, acizi graşi şi glicerol în cazul lipidelor sau nucleozide şi fosfaţi minerali în cazul acizilor nucleici. Aceşti produşi de hidroliză ("digestie") pot pătrunde prin peretele celular şi membrana citoplasmatică în mod pasiv, dar traversarea este lentă şi singură nu poate asigura metabolismul celular.

Membrana citoplasmatică conţine însă agenţi transportori activi, numiţi permeaze, ce acţionează ca enzime transportoare. Permeazele sînt biocatalizatori inductibili. Spre exemplu, cînd mediul de cultură conţine lactoză, în membrana citoplasmatică se sintetizează galactozid-permeaza care o transportă în citoplasmă unde va fi hidrolizat de β-galactozidază într-o moleculă de glucoză şi una de galactoză.

3.4.4.2. Catabolismul hidraţilor de carbon

Toţi hidraţii de carbon pot fi hidrolizaţi şi utilizaţi ca sursă de energie şi carbon de către bacterii, printr-o mare varietate de căi.

Celuloza, care este polizaharidul cel mai răspîndit în natură, este hidrolizată de microorganismele celulozolitice, bacterii(Cytophaga, Bacillus, Streptomyces, Clostridium) şi mucegaiuri (Aspergillus, Cladosporium,Thricoderma,etc) care sintetizează şi elimină în mediu celulaza. Celulaza este un complex enzimatic care catalizează o dublă hidroliză a celulozei. Mai întîi celuloza este hidrolizată în celobioză iar aceasta în glucoză.

Amidonul, polimer constituit din amiloză şi amilopectină, este hidrolizat de microorganismele amilolitice(Bacillus Clostridium, Aspergillus, Rhizopus, ş.a.) care conţin amilază. Si amilaza este un complex enzimatic constituit din 2 enzime: α-amilaza şi β-amilaza. Aceasta din urmă este exclusiv vegetală. Din hidroliza amidonului rezultă dextrine şi maltoză. Maltoza este apoi clivată în două molecule de glucoză. La microorganisme se întîlnesc α-amilaze care produc în locul maltozei direct glucoză.

Pectina, constituient al membranelor vegetale, în special al fructelor, este un polimer de acid β-galacturonic. Hidroliza pectinei poate fi realizată de bacteriile pectinolitice (Erwinia, Clostridium ş.a.) şi mucegaiuri (Aspergillus, Penicillium, Cladosporium) graţie unui sistem enzimatic din care două enzime sînt esenţiale: pectin-esteraza şi poligalacturonidaza. Din hidroliză rezultă acid galacturonic care prin intervenţia altor enzime(reductază,dehidrază şi kinază)

este transformat în 2-ceto-3 dezoxi-6-P-gluconat.

Chitina, constituient principal al învelișului extern de la artropode, este un polimer de chitibioză sau β-N-acetilglucozamină. Hidroliza sa pînă la glucoză este realizată de bacteriile chitinolitice (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*) după un mecanism enzimatic complex și puțin cunoscut.

Hidroliza microbiană a polizaharidelor are o mare importanță ecologică, iar din punct de vedere practic ea prezintă interes deosebit în fermentațiile industriale. Dizaharidele rezultate sînt apoi hidrolizate enzimatic în monozaharide.

lactoză —(galactozidază)→ glucoză+galactoză

maltoză —(maltază)→ 2 glucoză

zaharoză —(invertază)→ glucoză+fructoză

Catabolismul glucozei

Glucoza adăugată ca atare în mediul de cultură, sau cea provenită din hidroliza poli-sau dizaharidelor, în celula bacteriană este supusă unor variate căi de descompunere, funcție de specia sau grupul de specii considerate.

In general, principalele căi de degradare ale glucozei sînt:

-**calea Embden-Meyerhof** (calea glicolitică) prin care glucoza este transformată în acid piruvic, placă turnantă a metabolismului conectată la o serie de procese fermentative și oxidative;

-**calea pentozo-fosfatilor**, o alternativă a glicolizei și a cărei punct de plecare îl constituie 6-P-gluconatul, produs al oxidării glucozei;

-**căile oxidării complete a glucozei** în CO_2 și H_2O care se realizează după două mecanisme: primul se efectuiază prin intermediul piruvatului, respectiv prin calea Embden-Meyerhof și apoi prin ciclul Krebs, al doilea utilizează în parte calea pentozelor, respectiv **șuntul hexozomonofosfatilor**.

Calea Embden-Meyerhof (calea hexozo-difosfaților). Această cale este foarte răspîndită la microorganisme (bacterii, levuri, mucegaiuri) ca și la animalele superioare.

Principalele reacții chimice ale căii Embden-Meyerhof sînt schițate în figura nr.30.

Aceste reacții se petrec în patru etape principale:

a) Activarea hexozei. Glucoza este activată mai întîi în glucoză-6-P, apoi în fructoză-1-6-P-P, prin intermediul fructozei-6-P.

b) Clivarea hexozei. Fructoza -1-6-P-P este clivată de aldolaza, în două molecule de trioză-fosfat: dehidroxiacetona-fosfat și 3-P-gliceraldehida. Aceste două trioze sînt în echilibru, izomerizarea lor fiind catalizată de triozo-fosfat-izomeraza. Pe măsură ce 3-P-gliceroaldehida este catabolizată, dehidroxiacetona-fosfat se izomerizează în 3-P-gliceroaldehidă.

c) Oxidarea triozei-fosfat. Reacția de oxidare a 3-P-gliceroaldehidei este realizată de triozo-fosfat-dehidrogenază în prezența NAD și a fosfatului mineral. Aceasta înseamnă o fosforilare la nivelul substratului, iar NAD se reduce în $NADH_2$.

d) Formarea piruvatului. Reacțiile biochimice prin care se formează piruvatul sînt însoțite de transferul a două legături esterfosforice pe ADP rezultînd două molecule de ATP.

Din punct de vedere energetic convertirea unei molecule de glucoză în două molecule de piruvat duce la un cîștig de 2 moli de ATP.

Plecînd de la acest trunchi comun, microorganismele, după caz, pot utiliza căi divergente funcție de modul de reoxidare a $NADH_2$ format. In aerobioză, oxigenul molecular fiind acceptorul final de electroni, prin intermediul respirator, piruvatul este complet oxidat în CO_2 și H_2O prin ciclul Krebs. In anaerobioză, acceptorii finali de electroni sînt diferiți metaboliți organici: piruvatul însuși în cazul fermentației homolactice, acetaldehida în fermentația alcoolică, etc. Dar, pe lîngă aceste două căi fermentative clasice se cunosc numeroase alte fermentații de mare importanță indus-

GLUCOZA
ATP
P
Hexokinază
Glucozo-6-fosfatază
ADP
H_2O
GLUCOZA-6-FOSFAT
Fosfohexoizomerază
FRUCTOZA-6-FOSFAT
ATP
P
Fosfohexokinază
Fructoză-1,6-difosfatază
ADP
H_2O
FRUCTOZA-1,6-DIFOSFAT
Aldolază
DIHIDRO-OXIACETONA FOSFAT
Triozfosfat izomeraza
3-FOSFO GLICERO ALDEHIDA
licerin-
osfat dehi-
rogenaza
$NADH_2$
NAD
NAD
$NADH_2$
H_3PO_4
Triozfosfat dehidrogena
ALFA GLICEROFOSFAT
ACID-1,3-DIFOSFOGLICERIC
Fosfatază
ADP
ATP
Fosfoglicerat kinaza
GLICERINA
ACID-3- FOSFOGLICERIC
$+H_3PO_4$
Fosfoglicero-mutaza
ACID-2-FOSFOGLICERIC
H_2O
Enolaza
ACID =2-FOSFOENOLPIRUVIC
ADP
ATP
Piruvat-kina
ACID PIRUVIC

Fig.nr.30.Calea Embden-Meyerhoff

trială. Toate însă pleacă de la piruvat, placa turnantă metabolică, punctul final al căii glicolitice. In toate cazurile piruvatul suferă o decarboxilare oxidativă cu formare de acetil-coenzima A (acetatul activat) care posedă o legătură tioesterică, bogată în energie.

Cele mai importante căi fermentative care pleacă de la piruvat sînt schematizate în figura nr.31.

2H
CO_2
2H
LACTAT
PIRUVAT
ALDEHIDA ACETICA
ETANOL
CO_2
ATP
PIRUVAT
MALACETAT
2H
CO_2
ACETOLACTAT
CO_2
Clostridii
Coli-Aerogenes
CO
MALAT
CO_2
ACETOINA
H_2O
H_2 + CO_2 + Acetil-CoA + FORMIAT
2H
+4H
SUCCINAT
2,3-BUTANDIO
ACETAT
ACETOACETAT
ETANOL
PROPIONAT
CO_2
4H
ACETONA
BUTIRAT
2H
2H
IZOPROPANOL
BUTANOL

Fig.nr.31.Principalele căi fermentative care pleacă de la piruvat.

Ciclul Krebs. La microorganismele aerobe ca și la organismele superioare, oxidarea completă a glucozei este asigurată de ciclul Krebs. Această cale de oxidare nu este specifică numai metabolismului glucidic deoarece acetatul, care va suferi oxidarea totală, provine în egală măsură și din β-oxidarea acizilor grași ca și oxidarea acizilor aminici. Din această cauză ciclul Krebs este considerat ca fiind calea

oxidativă comună celor trei metabolisme intermediare:glucidic, lipidic şi protidic.

Ciclul Krebs este amorsat de condensarea aldolică, în prezenţa unei liaze, a acetil-coenzimei A cu oxalacetatul format prin carboxilarea piruvatului, rezultînd citratul.Citratul, sub influenţa aconitazei trece în cisaconitat şi apoi în izocitrat care va fi dehidrogenat (izocitrat-dehidrogenaza) în oxalsuccinat. Acesta suferă o decarboxilare şi se transformă în α-cetoglutarat. α-cetoglutaratul se transformă în succinil-coenzima A, apoi în succinat printr-o decarboxilare oxidativă şi o dezacilare consecutivă. Succinatul este oxidat în fumarat iar acesta hidratat în malat, care va fi apoi oxidat regenerînd oxalacetatul. Etapele ciclului Krebs sînt prezentate în figura nr.32.

O privire de ansamblu asupra etapelor ciclului Krebs relevă faptul că dintr-un metabolit cu 2 atomi de C (acetatul) şi altul cu 4 atomi de C (oxal-acetatul) ia naştere mai întîi un compus cu 6 atomi de C (citratul) care pe parcursul următoarelor 9 etape este redus la acelaşi component iniţial cu 4 atomi de C(oxal-acetatul). In etapele 5 şi 6 ale ciclului, cei doi atomi de C sînt eliberaţi sub formă de CO_2. Paralel, dehidrogenazele (2 NAD, NADP şi FAD) fixează de patru ori cîte 2 atomi de hidrogen (2 $NADH_2$, $NADPH_2$, $FADH_2$) care prin intermediul lanţului reacţiilor respiratorii vor fi oxidaţi cu formarea de 4 H_2O şi eliberarea energiei corespunzătoare. Legătura ciclului Krebs cu lanţul reacţiilor respiratorii este schiţată în figura nr.33.

Semnificaţia biologică a ciclului Krebs este deosebită deoarece:

-reprezintă etapa finală a oxidărilor celulare şi punctul central de convergenţă metabolică a glucidelor, lipidelor şi protidelor;

-produce, eşalonat, cea mai mare cantitate de energie prin oxidarea completă a glucozei în CO_2 şi H_2O;

-furnizează celulei schelete carbonice utilizate în biosinteza unor constituienţi celulari esenţiali;

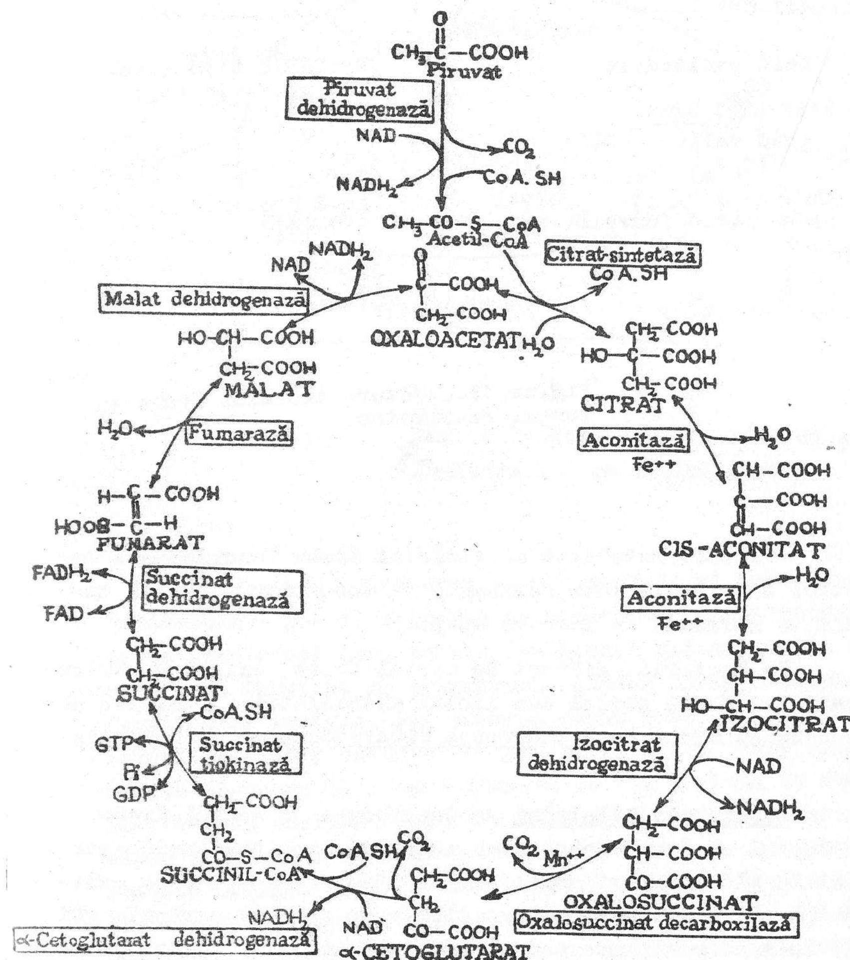


Fig.nr.32.Ciclul Krebs.

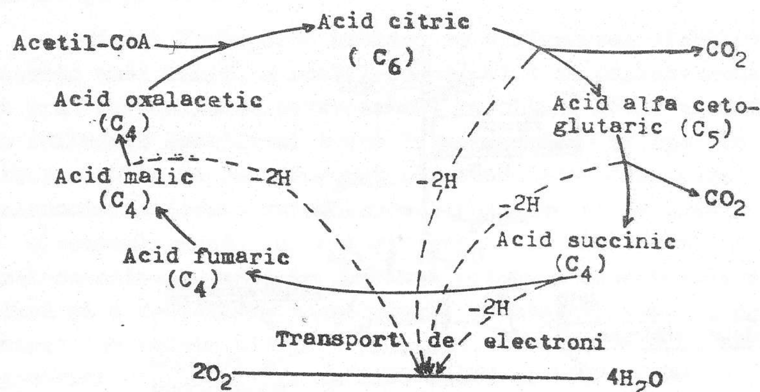


Fig.nr.33.Legătura ciclului Krebs cu lanţul respirator.

-Fiecare metabolit al ciclului Krebs funcţionează catalitic: o moleculă este consumată şi concomitent o altă moleculă se formează în fiecare etapă.

La bacterii, alături de ciclul Krebs, există o variantă a acestuia, numit şuntul sau ciclul glioxilatului, descris de Korenberg şi Krebs la <u>Pseudomonas fluorescens</u> şi <u>Escherichia coli</u>.

<u>Ciclul glioxilatului</u> se deosebeşte de ciclul Krebs prin faptul că izocitratul, sub acţiunea izocitratazei, este clivat în glioxilat şi succinat. Succinatul nu mai este mobilizat pe calea ciclului ci constituie un schelet carbonic utilizat în multiple procese de biosinteză (glucide, acizi aminici, pirimidine, etc.). Glioxilatul captează un radical acetat, sub formă de acetil-coenzima A şi trece în malat, sub acţiunea malatsintetazei, cu eliberarea de CoA. Malatul este apoi transformat, prin oxidare, în oxalacetat şi ciclul poate reîncepe prin condensarea cu o altă moleculă de acetil coenzimă A . (Fig.nr.34).

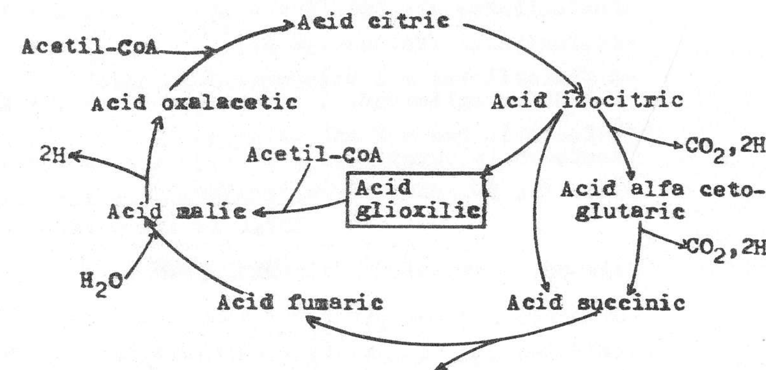


Fig.nr.34.Ciclul glioxilatului şi legătura lui cu ciclul Krebs.

Ambele cicluri sînt interconectate şi toţi compuşii lor intermediari pot fi folosiţi ca precursori în diferitele procese de biosinteză dar, în timp ce ciclul glioxilatului este prin excelenţă furnizor de precursori, ciclul Krebs este predominant furnizor de energie. Din această cauză este de o importanţă esenţială pentru bacterii ca ele să-şi poată regla cantitatea de acetil-coenzimă A care urmează să fie inclusă în fiecare din aceste două cicluri, pentru a face faţă cerinţelor metabolice mereu fluctuante funcţie de condiţiile în care se dezvoltă. Această reglare se face prin controlul sintezei şi activităţii izocitratazei. Astfel, izocitrataza este puternic inhibată de succinat, produsul activităţii sale catalitice, în timp ce acetatul stimulează sinteza şi activitatea ei.

Bilanţul energetic al acestei căi de catabolizare a glucozei poate fi evaluat prin numărul molilor de ATP produşi, ştiut fiind că fiecare mol de ATP format din ADP asigură recuperarea de 8 kcal.

Bilanţul energetic al căii Embden-Meyerhof:

-fosforilarea glucozei	- 1 ATP
-fosforilarea fructozei-6-P.	- 1 ATP
-difosforilarea a 2 mol de 1-3 difosfoglicerat.	+ 2 ATP
-defosforilarea a 2 mol de fosfo-enolpiruvat.	+ 2 ATP
-oxidarea 3-fosfoglicerolaldehidei.	+ 6 ATP
TOTAL 10 ATP-2 ATP =	8 ATP

Bilanţul energetic al ciclului Krebs:

-oxidarea a 2 mol piruvat(2.$NADH_2$)	6 ATP
-oxidarea a 2 mol izocitrat(2 $NADPH_2$). . .	6 ATP
-oxidarea a 2 mol α -cetoglutarat (2 $NADH_2$).	6 ATP
-dezacilarea succinil-coenzimei A (2 GTP)	2 ATP
-oxidarea succinatului(2 $FADH_2$).	4 ATP
-oxidarea malatului (2 $NADH_2$).	6 ATP
TOTAL =	30 ATP

Oxidarea completă a unei molecule de glucoză, pe cale aerobă produce deci 38 mol.ATP, respectiv 38 x 8 = 304 kcal. Dacă ţinem seamă că oxidarea chimică completă a unei molecule de glucoză produce 688 kcal, atunci randamentul energetic biologic este de circa 40%: $\frac{304 \times 100}{688} = \sim 40\%$

In cazul fermentaţiei alcoolice sau homolactice,calea biochimică pînă la acidul piruvic este aceiaşi dar cele două molecule de $NADH_2$ rezultate nu sînt oxidate prin lanţul respirator ci electronii lor sînt utilizaţi pentru reducerea piruvatului în acid lactic sau a aldehidei acetice în etanol. In aceste condiţii se formează numai 2 moli de ATP (8-6 = 2) iar randamentul energetic va fi numai de circa 2%: $\frac{16 \times 100}{688} = \sim 2\%$.

Calea Warburg-Christian. Este o cale de oxidare anaerobă a glucozei după o prealabilă fosforilare, întîlnită la numeroase specii bacteriene aerobe sau anaerobe (*Lactobacillus*, *Pseudomonas*,enterobacterii ş.a.)Fig.35.

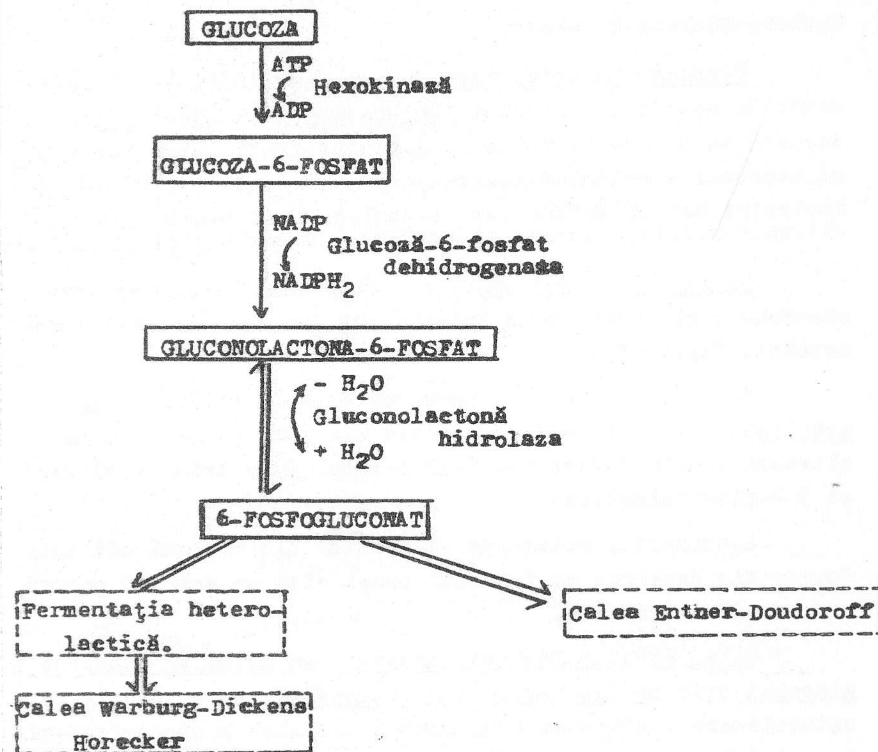


Fig.nr.35.Calea Warburg-Christian.

Glucoza în prezenţa ATP şi a hexokinazei este mai întîi fosforilată la C_6 formînd glucoză-6-P care apoi va fi oxidată, în prezenţa glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza NADP dependentă, în 6-fosfo-gluconolactonă. Aceasta fixează o moleculă de H_2O şi devine 6-fosfo-gluconat. In felul acesta oxidarea directă a glucozei ia sfîrşit.

6-fosfogluconatul este un macaz metabolic deoarece în condiţii de anaerobioză este metabolizată pe calea ciclului pentozofosfaţilor (fermentaţia heterolactică), ori pe calea Entner-Deudoroff (fermentaţia alcoolică) iar în aerobioză este oxidată complet prin şuntul hexozomonofosfaţilor(calea

Warburg-Dickens-Horeker).

Fermentația heterolactică,este întîlnită la un mare număr de specii ale genului Lactobacillus și Leuconostoc. Această cale duce la formarea acidului lactic,etanolului,CO_2 și eventual a acidului acetic.Enzima caracterististică a fermentației heterolactice este pentulozo-fosfat-cetolaza,care clivează xiluloza în acetil-fosfat și trioză-fosfat.Fig.nr.36.

Calea Entner-Doudoroff caracterizează transformarea anaerobă a glucozei, prin intermediul 2-ceto-3-dezoxi-gluconatului. Fig.nr.37.

Ea duce în final la formarea etanolului(Zymomonas mobilis). Enzima specifică acestei căi este aldolaza care clivează 2-ceto-3-dezoxi-6-P-gluconatul în 2 trioze: piruvat și 3-P-gliceraldehide.

Randamentul energetic al acestor ultime două căi este foarte mic deoarece se formează numai cîte un mol ATP pentru o moleculă de glucoză.

Calea Warburg-Dickens-Horecker sau oxidarea completă a glucozei prin șuntul hexozo-monofosfaților. Această cale de catabolizare a glucozei este comună cu calea pentozo-fosfaților pînă la formarea xilulozei-5-P. Aceasta suferă o serie de interconversiuni, catalizate de trans-cetolaze și transaldolaze, regenerînd pe cale ecolită hexozo-monofosfat. Fig.nr.38.

Din punct de vedere energetic, pentru fiecare moleculă de glucoză oxidată, pe această cale, pînă la CO_2 și H_2O, rezultă 12 moli $NADPH_2$ a căror oxidare va furniza 36 moli ATP. Întrucît la fosforilarea inițială a glucozei s-a consumat 1 mol ATP, rezultă că bilanțul energetic este de 35 moli ATP.

Calea Warburg-Dickens-Horecker întîlnită la bacterii (Acetobacter, Pseudomonas, Escherichia coli), levuri(Torula) și mucegaiuri (Aspergillus) se caracterizează, pe de o parte, prin producerea de $NADPH_2$ necesar proceselor de biosinteză, iar pe de altă parte, dă naștere la numeroase pentoze și hexoze de asemenea necesare proceselor energetice sau de biosinteză.

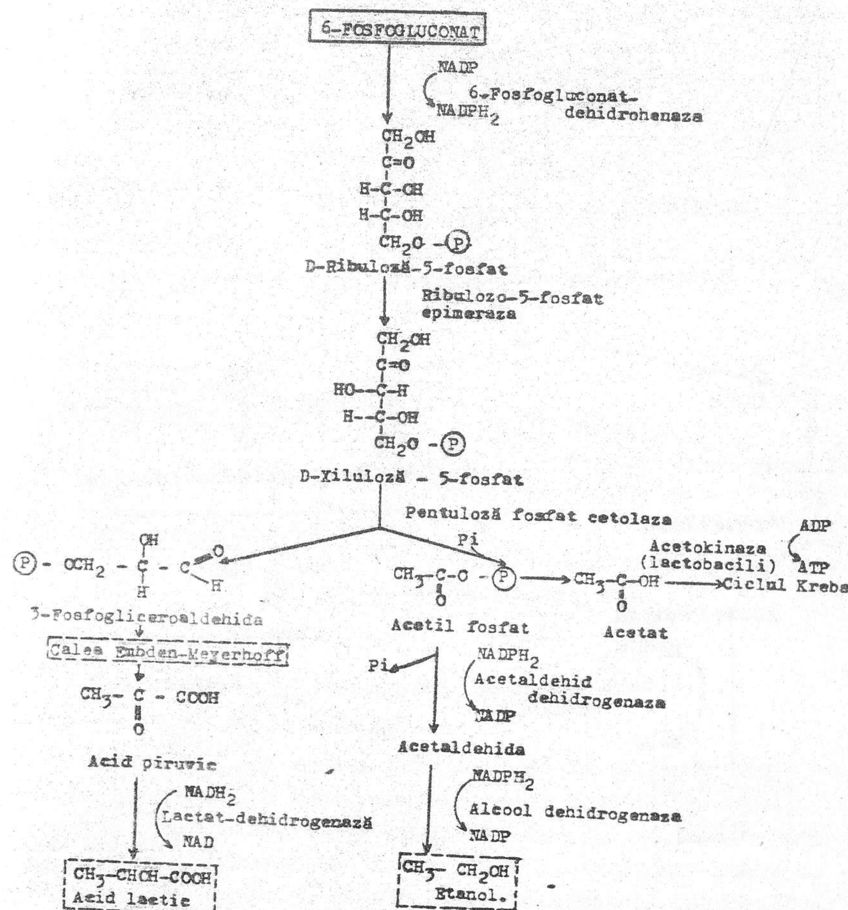


Fig.nr.36. Fermentația heterolactică.

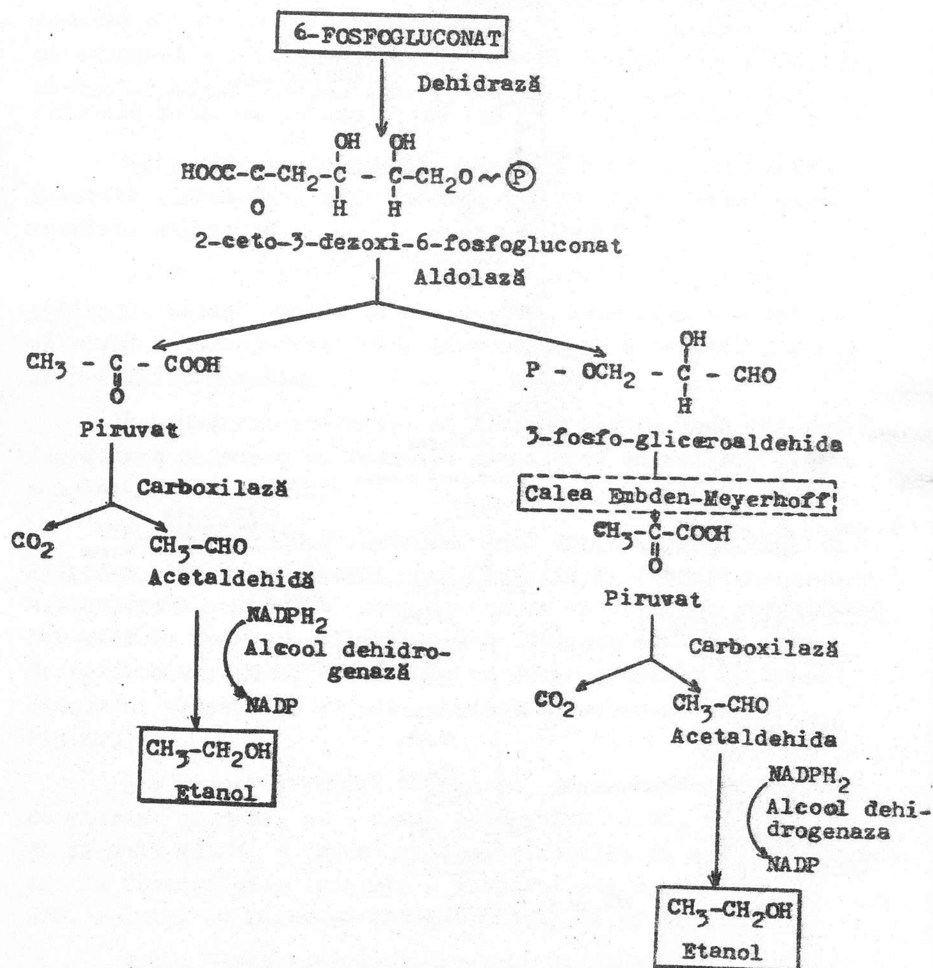


Fig.nr.37.Calea Entner-Doudoroff.

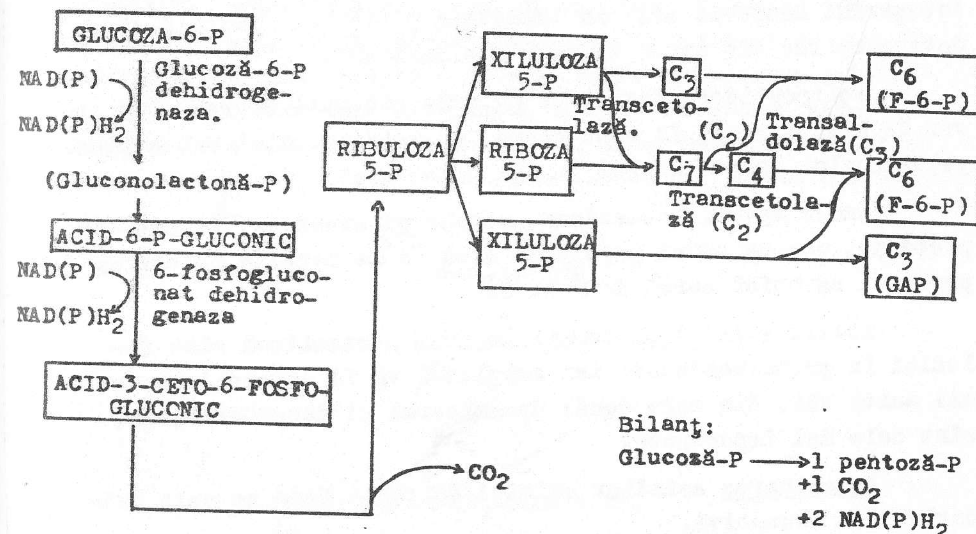


Fig.nr.38.Calea Warburg-Dickens-Horecker sau şuntul hexozo-monofosfaţilor.

3.4.4.3.Catabolismul proteinelor şi a acizilor aminici

Proteinele din mediul ambiant, sau de cultură, din cauza moleculelor lor mari, înainte de a pătrunde în celula bacteriană, sînt hidrolizate enzimatic în peptide cu moleculă mică. Enzimele proteolitice (exoenzime) sînt răspunzătoare de hidroliza proteinelor în peptide, iar peptidazele (endoenzime) hidrolizează peptidele în acizi aminici. Ansamblul reacţiilor care asigură hidroliza proteinelor pînă la acizi aminici poartă numele de proteoliză. Bacteriile care posedă proteaze exocelulare şi care sînt capabile să utilizeze proteinele ca unică sursă de azot şi chiar de carbon, se numesc proteolitice.
Din această grupă fiziologică fac parte atît bacterii aerobe (Bacillus subtilis, Bacillus anthracis, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Proteus vulgaris, unele tulpini de

stafilococ şi streptococ ş.a.) cît şi bacterii anaerobe,dintre care unele foarte active (Clostridium histolyticum, Clostridium sporogenes, etc.). Proteazele bacteriene prezintă un interes industrial deosebit atît în industria pielăriei, textilă şi a detergenţilor cît şi în industria alimentară.

Polipeptidele rezultate în urma acţiunii proteazelor, vor fi hidrolizate, în continuare, în acizi aminici sub acţiunea peptidazelor endocelulare.

Unele specii bacteriene, aerobe şi anaerobe, lipsite de proteaze, posedă numai peptidaze ceea ce le permite folosirea peptonei ca unică sursă de N şi C.

Acizii aminici eliberaţi în urma proteolizei sînt folosiţi în proteinosinteză iar surplusul va fi catabolizat pe mai multe căi, din care două: dezaminarea şi decarboxilarea, sînt cele mai importante.

Dezaminarea acizilor aminici se poate face pe cale oxidativă sau reductivă.

Dezaminarea oxidativă este cel mai frecvent întîlnită şi ea conduce la formarea de acizi cetonici şi amoniac(Fig.39). Coenzimele implicate sînt flavinice (FAD, FMN).

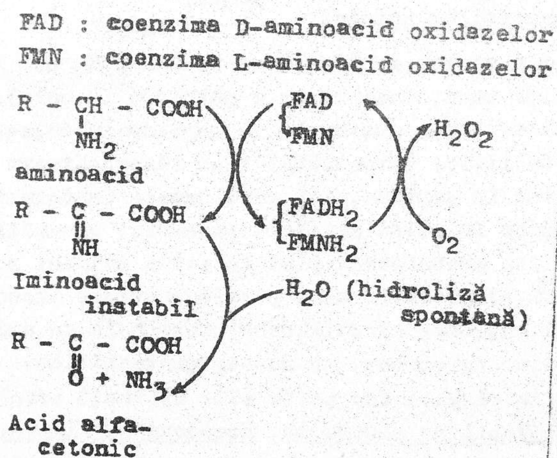


Fig.39.Dezaminarea oxidativă.

Dezaminarea reductivă sau reacţia Stickland, numită încă şi dezaminarea cuplată, este întîlnită la bacterii anaerobe stricte, sporulate, din genul Clostridium. In acest tip de dezamimare unii acizi aminici joacă rol de donatori de electroni iar alţii sînt acceptori de electroni. Dezaminarea acidului aminic donator este catalizată de o dehidrogenază NAD-dependentă şi a cărei formă redusă $NADH_2$ dezaminează al doilea acid aminic.(Fig.40). Cetoacidul format în cursul primei reac-

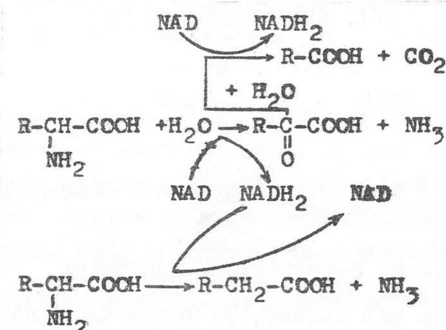


Fig.nr.40.Dezaminarea cuplată (reacţia Stikland).

ţii este adesea decarboxilat oxidativ cu formare de CO_2, iar amoniacul va fi transferat ciclului ornitină-citrulină-arginină, prin care se ajunge la acid glutamic şi lizină(Fig.nr.41).

Decarboxilarea acizilor aminici se realizează după schema:



$$R\text{-}CH_2.CH_2.CH.NH_2\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}CH_2.CH_2.CH_2NH_2 + CO_2$$

Metaboliţii rezultaţi sînt de regulă amine volatile, cu un atom de C mai puţin decît acidul aminic iniţial şi care sînt responsabile de mirosul specific şi dezagreabil de putrefacţie (cadaverină,putrescеină). Această cale catabolică o întîlnim la genurile Serratia, Aerobacter, Lactobacillus, Bacillus, Proteus, Clostridium, Escherichia ş.a.

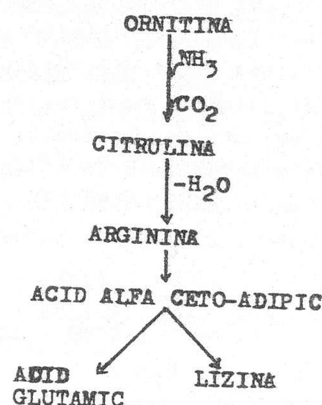


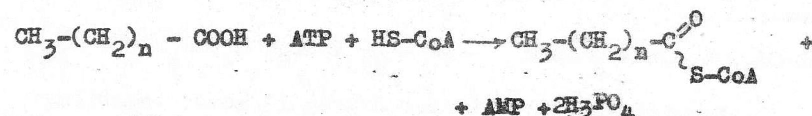
Fig.nr.41. Ciclul ornitină-citrulină la bacterii.

3.4.4.4. Catabolismul lipidelor

Bacteriile pot folosi, ca sursă de energie şi carbon, lipidele după ce în prealabil le hidrolizează cu ajutorul lipazelor exo şi endocelulare, în acizi graşi şi glicerol. Din această hidroliză rezultă frecvent acid palmitic şi acid stearic.

Glicerolul este preluat de ciclul reacţiilor din cadrul metabolismului glucidic.

Acizii graşi sînt oxidaţi după prealabila lor activare de către ATP şi apoi cuplarea cu CoA, conform schemei:



$$CH_3-(CH_2)_n-COOH + ATP + HS\text{-}CoA \longrightarrow CH_3-(CH_2)_n-C\begin{matrix}{=}O\\ S\text{-}CoA\end{matrix} + AMP + 2H_3PO_4$$

Etapa imediat următoare constă în dehidrogenarea acidului gras sub acţiunea sistemului enzimativ FAD, din care unele enzime acţionează de preferinţă asupra acizilor graşi cu lanţul lung (C_{14}-C_{18}) iar altele asupra acelora cu lanţul mijlociu sau scurt. Rezultatul acestei dehidrogenări este

scurtarea lanţului acidului gras cu 2 atomi de C, deoarece acetil-CoA care cuprinde aceşti 2 atomi de C se eliberează, iar procesul reîncepe pînă la descompunerea întregului lanţ în fragmente de 2 atomi de C.

Este, prin urmare, suficient ca acidul gras, indiferent de numărul atomilor de C din lanţul său, să fie activat de ATP şi cuplat cu CoA pentru a fi descompus treptat în unităţi cu 2 C, adică în acetil - CoA. Deoarece lanţul se micşorează treptat cu 2 C, cu formare de acizi β-hidroxi şi β-ceto, procesul poartă numele de beta oxidare.

In urma beta oxidării nu se produce CO_2 ci numai acetil-CoA. Pentru ca oxidarea acizilor graşi să fie totală, beta oxidarea trebuie să fie cuplată, în faza finală, cu ciclul Krebs în care acetil-CoA este catabolizată cu eliberare de CO_2 şi energie. Beta oxidarea este schematizată în fig.nr.42.

3.4.5. Nutriţia şi principalele tipuri trofice la bacterii

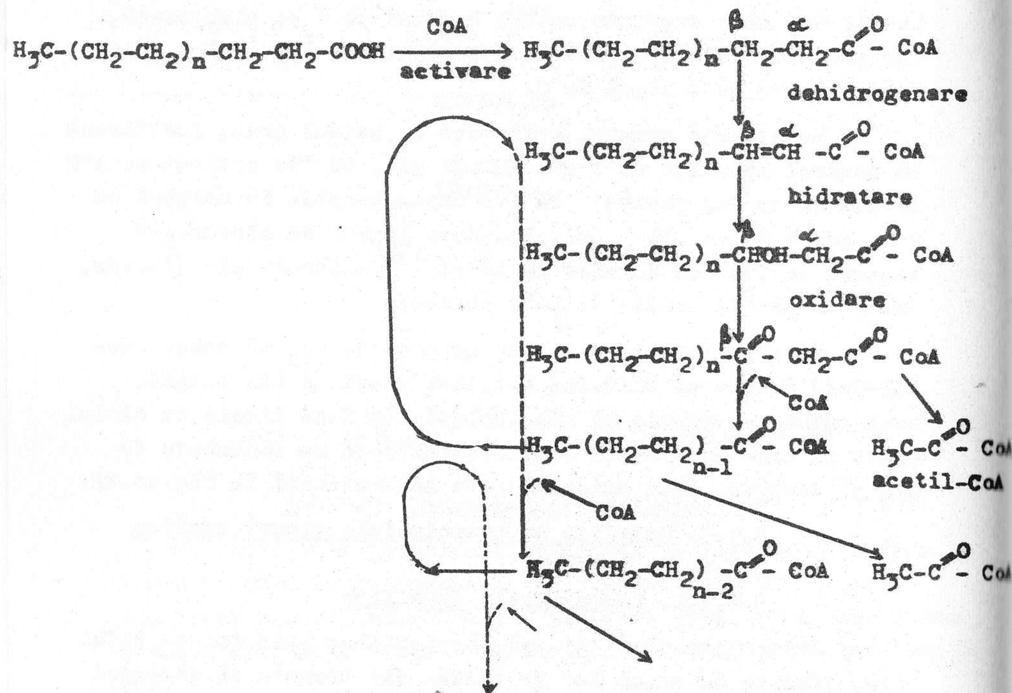
3.4.5.1. Necesităţile nutritive

Exigenţele nutritive ale bacteriilor sînt foarte diferite, funcţie de modul lor de viaţă. Ele trebuie să găsească în mediul în care trăiesc şi se dezvoltă:

a) substanţe plastice, necesare sintezei constituienţilor celulari;

b) substanţe energetice, care să furnizeze energia necesară proceselor de biosinteză şi celorlalte activităţi vitale.

Pe lîngă apă, care reprezintă, în medie, 75% din greutatea celulei, bacteriile necesită ca substanţe plastice, toate elementele care intră în compoziţia chimică a celulei: O,H,C sub formă de CO_2 sau compuşi organici, N sub formă mai mult sau mai puţin oxidată sau redusă, P sub formă de fosfaţi, S în stare oxidată sau redusă şi o serie de alte elemente minerale (K,Na,Cl,Fe,Ca,Mg) indispensabile menţinerii stării fizico-chimice a celulei. In plus, bacteriile mai au nevoie de oligoelemente (Cu,Zn,Mn,Co,Mo,Va) cu rol de activatori sau catalizatori ai unor sisteme şi reacţii enzimatice sau cu rol



Cînd n = 6 : $H_3C-(CH_2)_{12}-CH_2-CH_2-COOH \longrightarrow 8\ H_3C-C{=}O-CoA$

$[16C \longrightarrow 8(2C)]$

Fig.nr.42.Mecanismul oxidării acizilor grași. (Beta oxidarea).

în elaborarea unor vitamine și antibiotice.

Substanțele nutritive pot fi împărțite în patru categorii:

1)<u>Substanțele nutritive esențiale</u>, sînt acelea care fiind prezente în mediul exterior sînt capabile să pătrundă în celulă, prin difuziune sau transport activ, unde vor fi

încorporate, în procesele de asimilație, în constituienții celulari.

2)<u>Metaboliți esențiali</u>. Reprezintă produșii de transformare ai substanțelor nutritive esențiale, care se formează în citoplasma bacteriană. Ei nu pot fi utilizați ca atare din mediu deoarece pătrunderea lor în celulă se face foarte lent. De exemplu, glucoza este o substanță nutritivă esențială.Biosinteza metaboliților esențiali comportă o serie de reacții enzimatice intermediare. Dacă un metabolit esențial nu poate fi sintetizat de bacterie el trebuie să fie adăugat mediului de cultură, altfel bacteria își încetează creșterea și multiplicarea.

3)<u>Factorii de creștere</u>. Sînt metaboliți esențiali pe care unele bacterii nu îi pot sintetiza și trebuiesc adăugați în mediu. Ei sînt necesari bacteriilor în concetrații infime și se comportă, în general, ca vitaminele pentru organismul animal. Cu toate acestea, factorii de creștere nu sînt numai catalizatori biologici deoarece, între anumite limite de concentrație, ei exercită asupra ritmului de multiplicare o acțiune proporțională cu contrația lor. Acești factori există, în general, în mediile obișnuite pe bază de extract de carne sau extract de levuri, dar trebuie adăugați în mediile sintetice sau semisintetice. In tabelul nr.9 sînt trecuți principalii factori de creștere la bacterii.

<u>Tabel nr.9</u>

Factorii de creștere la bacterii

Factorul de creștere	Specia bacteriană
Acid para amino-benzoic	Acetobacter suboxidans Clostridium acetobutylicum
Acid folic	Lactebacillus casei Streptococcus faecalis Leuconostoc citrovorum
Biotina	Lactobacillus arabinosus Rhizobium trifolii Streptococcus faecalis
Acid nicotinic	Corynebacterium diphtheriae Lactobacillus arabinosus Proteus vulgaris

Factorul de creştere	Specia bacteriană
Riboflavina (vit.B_2)	Lactobacillus casei
	Streptococcus faecalis
Tiamina (vit.B_1)	Lactobacillus fermenti
	Neisseria gonorrhoeae
	Staphylococcus aureus
	Diplococcus pneumoniae
	Streptococcus salivarius
Vitamina B_6	Lactobacillus casei
	Streptococcus faecalis
	Clostridium welchii
Vitamina B_{12}	Lactobacillus casei
Vitamina K	Mycobacterium paratuberculosis
Colină	Dilpococcus pneumoniae
Acid aspartic,cisteină,glicină,lizină,prolină,fenilalanină	Leuconostoc mesenteroides.
Histidină,metionină,treonină	Streptococcus faecalis
Arginină	Lactobacillus casei
Tirozină	Lactobacillus delbruckii
Triptofan	Salmonella typhi
	Lactobacillus pentosus
Uracil	Staphylococcus aureus
	Shigella paradysenteriae
Adenină	Lactobacillus plantarum
Timină	Streptococcus lactis
Acid pantotenic	Lactobacillus casei
	Proteus morgani
	Clostridium tetani

O delimitare netă între cele trei categorii de substanţe nutritive nu se poate face, deoarece o aceiaşi substanţă organică poate fi pentru unele specii substanţă nutritivă esenţială, iar pentru altele metabolit esenţial. De asemenea, unii acizi aminici, baze purinice sau chiar vitamine pot fi pentru unele specii metaboliţi esenţiali iar pentru altele factori de creştere.

4)<u>Factori stimulanţi.</u> Aceştia sînt substanţe nutritive care accelerează ritmul de creştere al bacteriilor, atunci cînd sînt introduşi în mediu. Aşa se comportă glucoza şi unii din produşii ei de degradare, acidul lipoic pentru enterococi, un factor din gălbenuşul de ou pentru bacilul tuberculozei umane, unele peptide din extractul de pancreas pentru <u>Lactobacillus casei</u>,etc. Factorii stimulanţi sînt necesari numai la prima cultură a unei bacterii izolate din mediul ei natural pe un mediu artificial, deoarece foarte

repede bacteria respectivă dobîndeşte capacitatea de a-i sintetiza.

3.4.5.2.<u>Tipurile trofice</u>

După natura sursei de carbon şi potenţialul sintetic, bacteriile pot fi împărţite în două tipuri trofice fundamentale: autotrof şi heterotrof.

A.<u>Bacteriile autotrofe</u>, utilizează ca unică sursă de carbon CO_2 sau sărurile sale minerale. Bacteriile autotrofe, dotate cu un potenţial sintetic total, sînt capabile să-şi sintetizeze proprii constituienţi organici structurali(proteine, glucide, lipide) sau funcţionali (enzime, vitamine) exclusiv pe seama substanţelor minerale simple (CO_2.NH_4,PO^{--},SO_4^{--}, oligoelemente). Această imensă capacitate de sinteză presupune existenţa unui echipament enzimatic deosebit de complex şi variat reclamă prezenţa unei surse de energie şi a unei puteri reducătoare (H_2) care să permită reducerea CO_2.(Fig.nr.43). Substanţele care furnizează puterea reducătoare necesară reducerii CO_2 sînt: apa, H_2S,S, etc.

Unele specii din acest tip trofic sînt autotrofe stricte (bacteriile nitrificatoare şi sulf-oxidante nepigmentate),altele sînt autotrofe facultative sau mezotrofe, deoarece pot utiliza ca sursă de carbon, fie CO_2 şi carbonaţii, fie o substanţă organică (genul <u>Hydrogenomonas</u> şi bacteriile purpurii nesulfuroase) bacteriile sulfatoreducătoare).

Funcţie de sursa de energie utilizată, bacteriile autotrofe pot fi:

a)fotoautotrofe sau fotosintetizante(utilizează energia luminoasă);

b)chimioautotrofe sau chimiolitotrofe(utilizează energia eliberată de oxidarea substanţelor minerale).

B.<u>Bacteriile heterotrofe</u>, folosesc ca sursă de carbon numai compuşii organici ai acestuia. Ele au un potenţial sintetic atenuat şi sînt chimiorganotrofe deoarece folosesc energia eliberată de oxidarea substanţelor organice. Funcţie de potenţialul lor sintetic, respectiv de numărul compuşilor

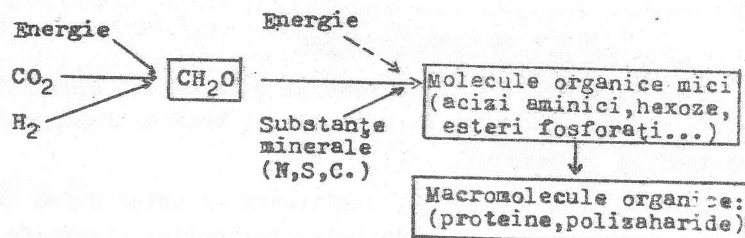


Fig.nr.43. Capacitatea sintetică a bacteriilor autotrofe.

organici necesari creşterii şi dezvoltării lor, se pot diferenţia două subtipuri:

a) bacterii protrotrofe şi
b) bacterii auxotrofe.

Bacteriile prototrofe necesită pentru dezvoltare o singură sursă de C organic. Ele sînt capabile să se dezvolte pe un mediu minimal ce conţine pe lîngă sursa de C(glucoză), o sursă de N amoniacal, fosfaţi, sulfaţi, K^{+}, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Zn^{++}. Din acest subtip trofic fac parte specii ca: Escherichia coli, Bacillus subtilis, specii de Pseudomonas, Azotobacter, etc. Un mediu minimal are următoarea compoziţie:

glucoză	1 g	$SO_4Fe.7H_2O$	5 mg
PO_4HK_2	10,5 g	$Cl_2Ca.2\ H_2O$	50 mg
PO_4H_2K	3,5 g	$Cl_2Mn.4\ H_2O$	5 mg
$ClNH_4$	0,5 g	apă distilată	1000 ml.
$SO_4Mg.7H_2O$	50 mg		

Bacteriile auxotrofe reprezintă majoritatea bacteriilor heterotrofe. Ele nu îşi pot sintetiza metaboliţii esenţiali, fiind lipsite de o serie de sisteme enzimatice, din care cauză se dezvoltă numai în mediile în care aceşti metaboliţi există preformaţi. Pentru ele metaboliţii esenţiali sînt, în general, factori de creştere.

Existenţa acestor tipuri trofice a ridicat problema evoluţiei fiziologice a bacteriilor.

După Horowitz şi Van Niel, bacteriile heterotrofe avînd un potenţial sintetic limitat pot fi considerate ca primitive. Ele ar fi evoluat, prin dobîndirea unor noi capacităţi sintetice, spre tipul autotrof.

Fildes, Knight şi Lwoff consideră însă că primitive au fost bacteriile autotrofe care au evoluat, prin pierderea progresivă a unor funcţii enzimatice şi deci a potenţialului sintetic, spre heterotrofie. Astfel bacteriile autotrofe primitive ar fi devenit dependente de alte organisme vii care să le furnizeze acei metaboliţi esenţiali pe care nu-i puteau sintetiza. Ipoteza evoluţiei de la autotrofism la heterotrofism concordă, după autorii citaţi, cu evoluţia fiziologică prin pierderea funcţiilor enzimatice întîlnită la protozoare.

Ambele ipoteze presupun apariţia, la un moment dat, a unui mutant fiziologic diferit de tipul original, capabil să-i ia locul.

Evident că o confirmare experimentală a uneia sau alteia dintre ipoteze, în prezent, este imposibilă dar, se pare că ipoteza în conformitate cu care evoluţia fiziologică s-a făcut de la tipul heterotrof la cel autotrof, a cîştigat deja terenul.

I. Bacteriile fototrofe(fotosintetizante)

Fotosinteza se realizează prin reacţii fotochimice cuplate cu reacţiile de biosinteză. Reacţia de transformare a energiei luminoase în energie chimică(formarea ATP) este cuplată cu apariţia unei "puteri reducătoare"(formarea de $NADH_2$):



Dacă la plantele verzi, pigmentul clorofilian este

clorofila "a", RH_2 (donatorul de hidrogen) apa, degajîndu-se O_2(R), la bacteriile fotosintetizante pigmenţii asimilatori sînt reprezentaţi de clorofilele bacteriene şi carotenoizi, donatorul de hidrogen (RH_2) nu este apa ci o altă sursă minerală (H_2S) sau organică şi nu se degajă niciodată O_2. Reacţia de biosinteză va fi:



$$CO_2 + 2\ NADH_2 \xrightarrow{E.L.} (CH_2O) + H_2O + 2\ NAD.$$

După natura donatorului de H (sursa reducătoare) folosit pentru reducerea CO_2 la un nivel de oxidare susceptibil de a intra în alcătuirea materialului celular, bacteriile fototrofe pot fi: fotolitotrofe şi fotoorganotrofe.

a) Bacteriile fotolitotrofe, folosesc ca donator de H_2 un compus mineral al sulfului, cel mai adesea H_2S, pe care îl oxidează în sulfaţi. Se cunosc două familii de bacterii fotolitotrofe:

-Familia Chlorobacteriaceae (bacteriile fotosintetizante verzi), cu trei genuri principale. (Tabel nr.10).

Tabel nr.10

Principalele genuri de Chlorobacteriaceae şi caracteristicele lor.

Caracteristicile	Genul
I.Celulele nu conţin vacuole de gaz:	
a.Bastonaşe sau vibrioni	Chlorobium
b.Coci reuniţi de prosthece	Prosthecochloris
II.Celule cu vacuole de gaz	Pelodictyon

-Familia Thiorhodaceae (bacterii fotosintetizante purpurii) cu 8 genuri principale (Tabel nr.11).

Ambele familii cuprind bacterii sulfuroase anaerobe care trăiesc în medii bogate în H_2S şi S. Pentru ele H_2S este principala sursă reducătoare pentru sintezele celulare plecînd de la CO_2, conform reacţiilor:



$$2\ H_2S + CO_2 \xrightarrow{E.L.} (CH_2O) + H_2O + 2\ S.$$

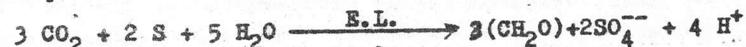
Această reacţie se petrece în condiţiile în care mediul conţine suficient H_2S iar S se depune intracitoplasmatic la Thiorhodobacterii sau extracelular la Chlorobacterii.

Tabel nr.11

Principalele genuri de Thiorhodaceae şi caracteristicile lor.

Caracteristicile	Genul
I. Depun sulful extracelular	
A.Bacili drepţi sau curbaţi, mobili	Ectothiorhodospira
II.Depun sulful intracelular	
A.Nu conţin vacuole de gaz	
1.Celule spirale, mobile	Thiospirillum
2.Celule sferice, mobile	Thiocystis
3.Celule sferice, imobile	Thiocapsa
4.Celule reniforme sau bacili scurţi, mobili	Chromatium
B.Conţin vacuole de gaz	
1.Celule sferice, mobile	Lamprocystis
2.Celule sferice, imobile	Rhodothece
3.Celule alungite, imobile	Amoehobacter

Cînd H_2S din mediu se epuizează S va fi oxidat în sulfaţi:



$$3\ CO_2 + 2\ S + 5\ H_2O \xrightarrow{E.L.} 3(CH_2O) + 2SO_4^{--} + 4\ H^+$$

b) Bacteriile fotoorganotrofe (fotoheterotrofe), folosesc ca donatori de hidrogen un compus organic (acizi graşi simpli sau alcooli). Ele constituie o singură familie Athiorhodaceae cuprinzînd bacterii purpurii, nesulfuroase, în general anaerobe (tabel nr.12).

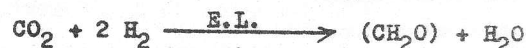
Tabel nr.12

Principalele genuri de Athiorhodaceae şi caracteristicile lor

Caracteristicile	Genul
I.Celule spiralate	Rhodospirillum

Caracteristicile	Genul
II. Celule în formă de bastonaşe	Rhodopseudomonas
A. Diviziunea prin fisiune binară	R.spheroides, R. capsulata, R.gelatinosa
B. Diviziunea prin fisiune inegală (inmugurire)	R.palustris, R.viridis
III. Celule ovale, eliptice cu apendici filiformi pe care se formează celule surori	Rhodomicrobium

Unele specii pot utiliza ca agent reducător hidrogenul:



$$CO_2 + 2\,H_2 \xrightarrow{E.L.} (CH_2O) + H_2O$$

iar altele se pot dezvolta la întuneric pe seama energiei furnizate de oxidarea unor substanţe organice reduse, în aerobioză.

Aparatul fotosintetic al bacteriilor este reprezentat de cromatofori, structuri membranoase analoage cloroplastelor. Cromatoforii bacterieni conţin bacterioclorofila şi pigmenţi carotenoizi. La <u>Thiorhodaceae</u> bacterioclorofila este marcată de pigmenţi carotenoizi purpurii. La <u>Chlorobacteriaceae</u> carotenoizii sînt în cantităţi foarte mici.

<u>Tabel nr.13</u>

Diferenţele dintre bacteriile purpurii, bacteriile verzi şi algele albastre-verzi.

Grupul	Principalii donatori de electroni în fotosinteză	Relaţia faţă de O_2	Principalele clorofile	Spectrul de absorbţie, nm.
Cyanobacterii (alge albastre verzi)	H_2O	aerobe	Clorofila a	670-685
Bacterii purpurii	H_2S şi/sau compuşi organici	Majoritatea anaerobe	Bacterioclorofila a sau b.	810-1015
Bacterii verzi	H_2S şi/sau compuşi or-	Anaerobe	Bacterioclorofilă c sau d	735-755

Diferenţele de structură chimică a bacterioclorofilelor şi prezenţa pigmenţilor carotenoizi determină şi diferenţele spectrelor de absorbţie. Bacterioclorofilele absorb radiaţiile cu lungimi de undă apropiată de aceia a radiaţiilor infraroşii (tabel nr.13) corespunzătoare unei zone a spectrului neperceptibilă pentru retina umană. Datorită acestui fapt bacteriile fotosintetice pot trăi în apele adînci, mîluri şi nămoluri. Utilizînd în fotosinteză radiaţiile infraroşii ele asigură obţinerea unui supliment de energie solară pe suprafaţa pămîntului. In mediu acvatic există o relaţie de complimentaritate între fotosinteza bacteriană şi cea algală. Algele, dezvoltîndu-se la suprafaţă, în aerobioză, absorb, în fotosinteză, radiaţiile albastre şi roşii, în timp ce bacteriile realizează fotosinteza în anaerobioză, în adîncime utilizînd radiaţiile infraroşii. In felul acesta, practic, toate radiaţiile spectrului sînt utilizate în fotosinteză.

Mecanismul fotosintezei bacteriene este diferit de cel al plantelor verzi, în primul rînd prin faptul că bacteriile nu pot realiza fotoliza apei şi nu produc O_2. Fotosinteza bacteriană este un proces strict anaerob iar bacteriile fotosintetizante sînt, aproape toate şi fixatoare de N_2 ca de altfel şi cyanobacteriile.

B.<u>Bacteriile chimiotrofe(chimiosintetizante)</u>

Din acest tip trofic fac parte bacterii autotrofe şi heterotrofe care utilizează energia eliberată din reacţiile de oxidare a compuşilor minerali (bacterii chimiolitotrofe) sau organici (bacterii chimiorganotrofe.

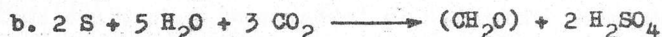
a)<u>Bacteriile chimiolitotrofe</u>, sînt autotrofe care folosesc ca donatori de electroni substanţele minerale. Din această categorie fac parte mai multe grupe:

1. Bacteriile sulfuroase nepigmentate - care obţin energia din oxidarea sulfului şi a compuşilor săi minerali. Sînt larg răspîndite în natură, în biotopuri bogate în H_2O şi S, cum sînt apele sulfuroase, nămol, mîl, ape de canal, mîne de sulf, etc. Principalii reprezentanţi ai acestui grup sînt:

-sulfobacteriile filamentoase (Beggiatoa, Thiothrix, Thioploca, etc.). Sînt aerobe iar energia eliberată din oxidarea S sau H_2S este folosită pentru reducerea CO_2 după reacțiile:



$$a.\ 2\ H_2S + CO_2 \longrightarrow 2\ S + H_2O + (CH_2O)$$



$$b.\ 2\ S + 5\ H_2O + 3\ CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + 2\ H_2SO_4$$

Aceste bacterii în urma oxidării H_2S depun S elementar în citoplasmă (reacția a) și numai în condițiile diminuării H_2S din mediu oxidează sulful citoplasmatic conform reacției b.

-sulfobacterii bacilare (Thiobacillus) care oxidează formele reduse ale sulfului (H_2S, S, S_2O_3) cu depunerea sulfului oxidat extracelular. Cele mai importante specii sînt:

-Thiobacillus thiooxidans care oxidează S în acid sulfuric cu acumularea acestuia în mediu:



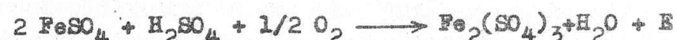
$$S + 1/2\ O_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_4 + E.$$

-Thiobacillus thioparus, aerob strict, oxidează numai tiosulfații:



$$5\ Na_2S_2O_3 + H_2O + 4\ O_2 \longrightarrow 5\ Na_2SO_4 + H_2SO_4 + E$$

-Thiobacillus ferrooxidans, aerob obligat, oxidează sărurile feroase:

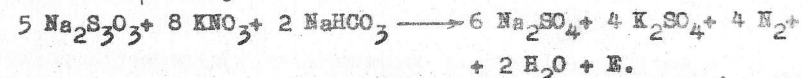


$$2\ FeSO_4 + H_2SO_4 + 1/2\ O_2 \longrightarrow Fe_2(SO_4)_3 + H_2O + E$$

-Thiobacillus denitrificans, oxidează S și compușii săi în anaerobioză în prezența nitraților pe care îi reduce pînă la azot molecular:

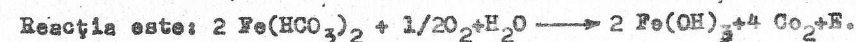


$$6\ KNO_3 + 5\ S + 2\ H_2O \longrightarrow K_2SO_4 + 4\ KHSO_4 + 3\ N_2 + E$$



$$5\ Na_2S_2O_3 + 8\ KNO_3 + 2\ NaHCO_3 \longrightarrow 6\ Na_2SO_4 + 4\ K_2SO_4 + 4\ N_2 + 2\ H_2O + E.$$

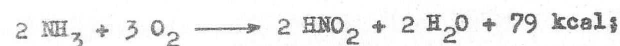
2.Ferobacteriile (Gallionella, Crenothrix, Leptothrix, etc.), răspîndite în apele feruginoase și oxidează carbonatul de fier în hidroxid feric coloidal care se depune în teaca lor mucilaginoasă.



Reacția este: $2\ Fe(HCO_3)_2 + 1/2O_2 + H_2O \longrightarrow 2\ Fe(OH)_3 + 4\ CO_2 + E.$

3.Bacteriile nitrificatoare. Aerobe stricte, răspîndite în sol și ape, aceste bacterii sînt agenții principali ai procesului de nitrificare. Nitrificarea se realizează în două etape:

a)Nitritarea -cînd NH_3 este oxidat în NO^- de specii ale genurilor: Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrocystis, după reacția:



$$2\ NH_3 + 3\ O_2 \longrightarrow 2\ HNO_2 + 2\ H_2O + 79\ kcal;$$

b)Nitratarea, sau oxidarea NO_2^- în NO_3^-, produsă de specii ale genurilor Nitrobacter, Nitrocystis, ș.a., după reacția:



$$HNO_3 + 1/2\ O_2 \longrightarrow HNO_3 + 21{,}6\ kcal.$$

4.Bacteriile de hidrogen, reprezentate de specii ale genului Hydrogenomonas. Ele oxidează hidrogenul molecular dar pot oxida și unii compuși organici, deoarece sînt autotrofe facultative.

5.Bacteriile metanigene, cu genurile Methanobacterium, Methanobacillus, Methanococcus și Methanosarcina, răspîndit în nămol, mlaștini și apa de canal. Sînt strict anaerobe și oxidează compuși minerali sau substanțe organice simple (acid formic, alcooli) folosind CO_2 ca acceptor final de hidrogen, cu formare de metan:



$$4\ H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$

Sînt, de asemenea, prezente în rumenul rumegătoarelor participînd la degradarea anaerobă a celulozei.

6.Bacteriile care oxidează oxidul de carbon. Răspîndite în sol acestea sînt autotrofe facultative, capabile să oxideze CO în CO_2. Specia tip este Carboxydomonas oligocarbophyla.

b)Bacteriile chimioorganotrofe. Există mai multe grupe de bacterii heterotrofe care utilizează ca donatori de electroni substanțele organice:

1.Bacterii care oxidează metanul. Methanomonas methanica, bacterie anaerobă strictă, cu habitatul obișnuit în apele de canal și nămol, utilizează CH_4 ca unică sursă de C și energie:



$$CH_4 + 2\,O_2 \longrightarrow CO_2 + 2\,H_2O + E.$$

2.Bacteriile fixatoare de azot molecular.Răspîndite în sol şi ape, fie în stare liberă (genurile Azotobacter, Beijerinckia,Derxia aerobe şi Clostridium pasteurianum anaerob), fie ca simbiente pe rădăcinile leguminoaselor(genul Rhizobium) ele utilizează substanţele organice ca donatori de electroni şi azotul molecular din atmosferă ca unică sursă de azot.

3.Bacteriile chimioheterotrofe sau chimioorganotrofe propriu zise. In această categorie sînt cuprinse marea majoritate a bacteriilor heterotrofe. După natura acceptorului final de electroni se deosebesc: bacterii chimiorganotrofe aerobe, bacterii chimioorganotrofe anaerobe şi bacterii chimioorganotrofe fermentative.

-Bacteriile chimioorganotrofe aerobe folosesc ca donator de electroni o substanţă organică iar ca acceptor final de electroni oxigenul. Unele specii (Diplococcus glycinophilus) utilizează ca donator de electroni numai un singur substrat-glicocolul; altele din contra pot oxida un număr foarte mare de substanţe organice (Pseudomonas multivorans oxidează peste 90 substanţe organice). De regulă generală, oxidarea substratului este completă, pînă la CO_2 şi H_2O. Totuşi, unele specii lipsite de anumite sisteme enzimatice, oxidează incomplet substratul ceea ce face ca în mediu să se acumuleze metaboliţi intermediari ca: acid fumaric, acid citric, acid oxalic şi cel mai frecvent acid acetic. Din această ultimă categorie fac parte, printre altele, bacteriile acetice aparţinînd genurilor Acetomonas şi Acetobacter.

-Bacteriile chimioorganotrofe anaerobe. La acestea acceptorul final de electroni îl constituie nitraţii, sulfaţii sau carbonaţii. Exemplu bacteriile sulfatoreducătoare şi bacteriile denitrificatoare heterotrofe.

-Bacteriile fermentative,sînt acelea la care acceptorul final de electroni este un metabolit organic, de regulă un produs al degradării oxidative a substratului. Substratul oxidabil are rol dublu: sursă de energie şi furnizor de acceptori de electroni. Aceste bacterii sînt agenţii principalelor

fermentaţii.(Tabel nr.14).

Tabel nr.14

Principalele tipuri de fermentaţii.

Fermentaţia	Microorganismele	Produşii finali
Alcoolică	Levuri.Bacterii:Zymomonas lindneri,Zymosarcina ventriculi.	Alcool etilic CO_2
Lactică(homofermentaţie)	Streptococcus,Lactobacillus(unele specii)	Acid lactic (randament 90%)
Lactică(heterofermentaţie)	Leuconostoc,Lactobacillus(unele specii)	Acid lactic (25-90%) ac. acetic,etanol, glicerol CO_2
Propionică	Clostridium propionicum Propionibacterium,Corynebacterium diphtheriae, Neisseria,Veillonella, Micromonospora.	Ac.propionic,ac. acetic,ac. succinic, CO_2.
Butirică-acetonobutanolică.	Butyribacterium,Zymosarcina maxima,specii de Clostridium şi Neisseria.	Alcool butilic, ac.butiric,acetonă,izopropanol,ac.acetic, etanol,H_2,CO_2.
Acidă mixtă	Escherichia,Salmonella, Shigella,Proteus.	Ac.lactic,ac. acetic, ac. formic,ac.succinic,H_2,CO_2, etanol.
Butilenglicolică	Aerobacter,Aeromonas, Bacillus polymyxa.	Etanol,acetonă, 2-3-butilenglicol,H_2,CO_2, ac.lactic, acet.

3.4.6. Anabolismul

Structurile esenţiale ale celulei bacteriene sînt constituite dintr-un număr mare de macromolecule,pe care celula trebuie să-i sintetizeze plecînd de la monomerii mediului de cultură sau de la cei furnizaţi de căile metabolismului intermediar.

Macromoleculele celulare sînt polimeri constituiţi dintr-un număr variabil de monometri identici(homopolimeri)

sau diferiți (heteropolimeri), dispuși linear sau ramificat. Prin hidroliză, polimerii eliberează subunitățile(monomerii) constituiente ceea ce dovedește că ei se formează prin reacții de dehidratare și că monomerii se asamblează prin legături anhidrice. In biosinteză monomerii sînt în prealabil activați prin cuplarea lor cu o moleculă macroergică, după care are loc incorporarea lor în polimer (tabel nr.15).

Tabel nr.15

Activarea monomerilor

Polimerul	Monomerul	Monomerul activat	Agentul activator	Tipul de legătură
Proteine	Acizi aminici	Aminoacil-AMP aminoacil-ARN_t	ATP,ARN_t	Peptidică
Polizaharide	Monozaharid	Monozaharid--NDP	NTP(nucleozid trifosfat)	Glicozidică
Acizi nucleici	Nucleozide monofosfat	Nucleozide trifosfat	ATP	Fosfodiester

3.4.6.1. Biosinteza proteinelor

Macromolecule complexe, proteinele sînt formate din 2o aminoacizi. Dintre aceștia numai unul singur,histidina, este sintetizat printr-o cale biosintetică deosebită. Ceilalți 19 acizi aminici sînt sintetizați de celula bacteriană prin căi biosintetice ce pleacă de la un număr relativ mic de precursori. După mecanismul de biosinteză acizii aminici pot fi grupați în 5 familii (tabel nr.16).

In molecula proteică acizii aminici sînt legați între ei prin legături peptidice, care unesc gruparea carboxil (COOH) de la unul cu gruparea aminică (NH_2) de la altul. Cu ajutorul acestui tip de legătură se formează lanțuri peptidice care la o extremitate se termină printr-un radical carboxil iar la cealaltă, printr-o grupare NH_2.

Secvenționalizarea acizilor aminici în macromolecula

proteică este riguros stabilită genetic și ea determină structura primară a moleculei. Lanțul polipeptidic se înrulează în jurul axului său, pe o porțiune din lungimea sa, formînd o structură regulată de tip halical, numită elice alfa(α), constituind structura secundară. Intreaga moleculă cu configurațiile helicale α se repliază căpătînd o arhitectură spațială tridimensională care este structura terțiară. Structura cuaternară a proteinelor este dată de asocierea mai multor lanțuri polipeptidice,fiecare prezentînd structura sa proprie primară, secundară și terțiară.

Tabel nr.16

Familiile de aminoacizi și căile biosintetice.

Precursorii	Acizii aminici	Familia
α-cetoglutarat → glutamat	→ glutamină → arginină → prolină	Glutamat
Oxalacetat → aspartat	→ asparagină → metionină → treonină → izoleucină (parțial) → lizină (parțial)	Aspartat
Fosfoenolpiruvat + eritroză-4-fosfat	→ fenilalanină (parțial) → tirozină(parțial) → triptofan(parțial)	Aromatică
3-fosfoglicerat → serină	→ glicină → serină	Serină
Piruvat	→ alanină → valină → leucină(parțial)	Piruvat
Fosforibozil-pirofosfat+ ATP	→ histidină (parțial)	

Proprietățile esențiale ale proteinelor,în primul rînd specificitatea lor, sînt determinate de structura primară, respectiv de secvenționalizarea acizilor aminici în lanțurile polipeptidice,care condiționează apoi structurile secundară și terțiară.

In procesul complex de biosinteză a proteinelor acizii

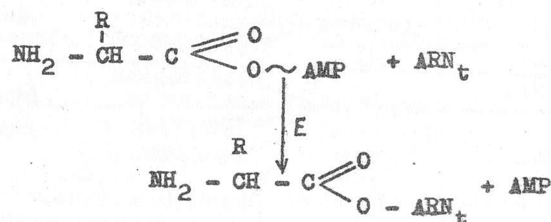
nucleici joacă un rol esențial. Mecanismul proteinosintezei comportă 3 faze:

1. **Activarea acizilor aminici.** Datorită unei enzime de activare și în prezența ATP se formează un complex între acidul aminic, acidul adenozin-monofosforic și enzimă cu eliberarea de pirofosfat. Legătura anhidridică dintre acidul aminic și AMP este bogată în energie:



$$ATP + NH_2 - \overset{R}{CH} - C \lessgtr^{O}_{O-H} \xrightarrow{E.} PP + NH_2 - \overset{R}{CH} - C \lessgtr^{O}_{O \sim AMP}$$

2. **Fixarea acidului aminic activat pe ARN.** Aceiași enzimă care a catalizat activarea acidului aminic determină disocierea lui de molecula AMP și fixarea pe molecula de ARN_t prin gruparea carboxil a acidului aminic și gruparea oxidril a unei riboze de la extremitatea molecului de ARN transportor(solubil).



$$NH_2 - \overset{R}{CH} - C \lessgtr^{O}_{O \sim AMP} + ARN_t \xrightarrow{E} NH_2 - \overset{R}{CH} - C \lessgtr^{O}_{O - ARN_t} + AMP$$

3. **Intervenția ribozomilor și a ARN.** Sinteza proteinei specifice începe în momentul cînd cele două subunități ribozomale, 30 S și 50 S, se apropie formînd ribozomii 70 S care se fixează pe porțiunea inițială a unei catene de ARN_m. Numai aceste complexe ribozomi-ARN_m au capacitatea de a fixa moleculele de ARN_t.

ARN_m - monocatenar, este constituit dintr-o succesiune de baze a căror secvență este o copie a aceleia din ADN. Grupe de cîte trei baze diferite, numite triplete, constituie codonii de care se vor atașa tripletele complimentare sau anticodonii moleculelor de ARN_t. Această complimentaritate este identică cu aceia care asigură asamblarea dubluhelixului de ADN, respectiv A - U; C - G. Riguroasa corespondență dintre baze determină natura acidului aminic transportat și fixat la nive-

lul situsului activ al ribozomului. Schematic proteinosinteza poate fi reprezentată astfel:(Fig.nr.44).

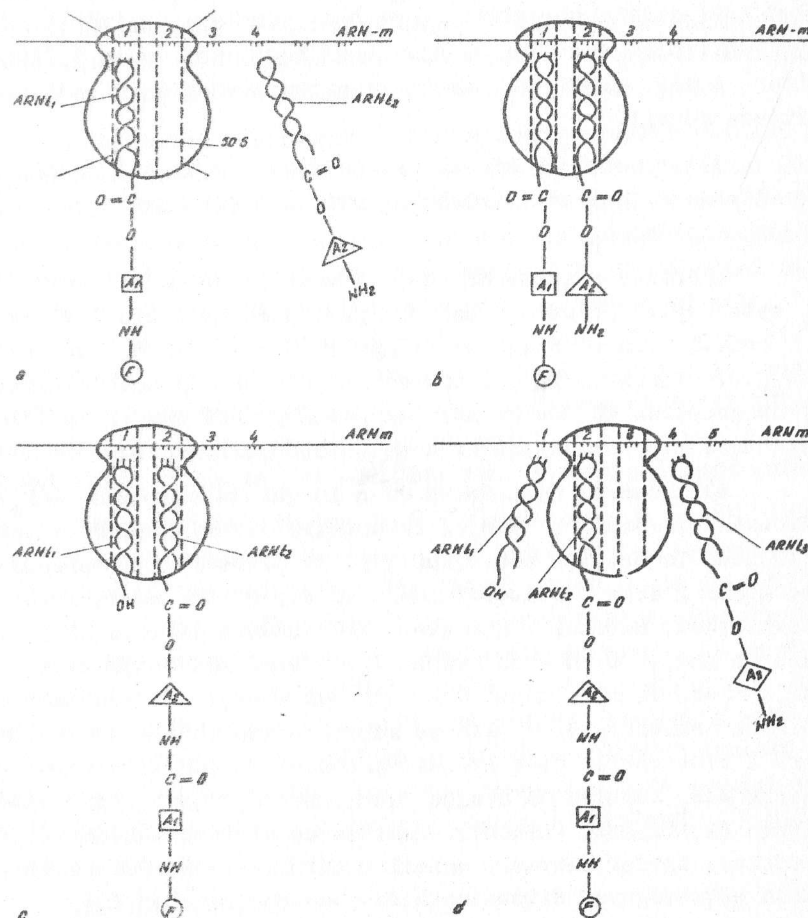


Fig.nr.44. Biosinteza proteinelor.
a) Formarea complexului ribozom 70S-ARN_m la nivelul unui situs specific inițial. ARN_{t1} purtător al acidului aminic A_1 se fixează la nivelul situsului A datorită corespondenței codon -1- anticodon-1.
b) Situsul B în prealabil liber este ocupat în aceleași condiții de un ARN_{t2} legat de un acid aminic A_2.
c) Transpeptidarea. Acizii aminici A_1 și A_2 sînt cuplați prin legătură peptidică CO-NH, ARN_{t2} poartă dipeptidul.
d) Translocația. Ribozomul se deplasează cu un triplet. ARN_{t1} este eliberat ARN_{t2} se află la nivelul situsului A. Situsul B este liber. Se reîntîlnește prima situație. Mai tîrziu ARN_{t2} va purta tripeptidul A_1-A_2-A_3.

Din schemă rezultă că:

a)Complexul ribozom-ARN_m fixează un ARN_t purtător al unui acid aminic specific A_1, pe baza complementarităţii codon$_1$-anticodon$_2$ la nivelul situsului A,situsul vecin,B,fiind liber. Acidul aminic A_1 poartă la extremitatea sa liberă o grupare formil.

b)Situsul B la rîndul său va fixa o moleculă de ARN_{t2}, purtătoare a unui acid aminic A_2,prin complimentaritate codon$_2$-anticodon$_2$.

c)Printr-o serie de reacţii enzimatice acidul aminic A_1 este cuplat printr-o legătură peptidică de acidul aminic A_2, constituind un fragment dipeptidic care rămîne fixat pe ARN_{t2}. Cuplarea se face între gruparea COOH a acidului aminic A_1 cu gruparea NH_2 de la A_2. Fenomenul poartă numele de transpeptidare şi e catalizat de o aminoacid-polimerază.

d)Ribozomul înaintează de-a lungul moleculei de ARN_m eliberînd codonul$_1$ şi ARN_{t1}. Situsurile active A şi B se vor afla acum în dreptul codonilor 2 şi 3. Situsul A din dreptul codonului 2 este purtătorul ARN_{t2} cu dipeptidul A_1-A_2 anterior formei. Situsul B din dreptul codonului 3 fiind liber va fixa un ARN_{t3} cu un acid aminic A_3. Transferul complexului ARN_{t2}-A_1-A_2 de la situsul B la situsul A este cunoscut sub numele de translocare. Ciclul se repetă odată cu fiecare înaintare a ribozomilor de-a lungul moleculei de ARN_m. In felul acesta ARN_m furnizează mesajul său genetic, înscris în succesiunea de triplete (codoni) simultan cu sinteza moleculei proteice. Astfel secvenţa acizilor aminici în lanţul polipeptidic este riguros determinată de secvenţa bazelor ARN_m. Procesul ia sfîrşit cînd ribozomul va atinge unul din codonii terminali nonsens : UAA, UAG, ai moleculei de ARN_m iar lanţul polipeptidic se desprinde de complexul ARN_t-ribozom-ARN_m. Mecanismul sintezei proteinelor ridică probleme de ordin genetic, pe care le vom menţiona succint.

Se ştie că ADN este un polimer format din patru tipuri de unităţi (nucleotide) corespunzătoare celor patru baze azotate cunoscute. Pe de altă parte, am văzut că proteinele sînt macromolecule constituite din asamblarea cîtorva acizi aminici

din cei 20 cunoscuţi. Secvenţa bazelor ADN conţine informaţia genetică şi determină înlănţuirea acizilor aminici în molecula proteică, dar care este mecanismul acestei înlănţuiri?.

Explicarea mecanismului înlănţuirii acizilor aminici în molecula proteică a plecat de la raţionamentul că dacă un acid aminic ar corespunde unei baze, proteina formată nu ar putea conţine decît 4 acizi aminici; dacă două baze codifică un acid aminic atunci proteina nu ar putea conţine decît 16 acizi aminici, ceea ce este insuficient deoarece se cunosc 20 acizi aminici. Trebuia deci să se admită că pentru codificarea unui acid aminic este necesar un triplet de baze. Această ipoteză permite 64 combinaţii posibile, adică teoretic 64 acizi aminici. Dar, întrucît nu se cunosc decît 20 acizi aminici, s-a admis că mai multe triplete pot codifica unul şi acelaşi acid aminic.

Corespondenţa dintre tripletele de baze şi acizii aminici, respectiv însăşi natura codului a putut fi înţeleasă mai bine datorită lucrărilor lui Nirenberg. Acest autor a avut ideea de a prepara ARN mesageri cu o compoziţie foarte simplă, formaţi spre exemplu, dintr-un singur tip de baze care se repetau la infinit. Primul dintre aceşti polinucleotizi era un lanţ constituit numai din uracil, un poli-U. Intr-un sistem acelular, poli-U era capabil să codifice o proteină formată dintr-o succesiune de fenilalanină. Aceasta a fost o primă şi strălucită demonstraţie a naturii codului: tripletului U-U-U îi corespunde fenilalanina.

In urma acestor experienţe s-au pus în evidenţă, în mod succesiv, natura tuturor tripletelor care codifică toţi acizii aminici.

Codul genetic este universal şi degenerat. Este universal pentru că un triplet de baze are întotdeauna aceeaşi semnificaţie, codificînd invariabil acelaşi acid aminic, dar în acelaşi timp este degenerat deoarece acelaşi acid aminic poate fi codificat de mai multe triplete.(Tabel nr.17).

Tabel nr.17

Codul genetic

Prima literă / A doua literă	U	C	A	G
U	UUU fen.	UCU ser.	UAU tir.	UGU cis.
	UUC fen.	UCC ser.	UAC tir.	UGC cis.
	UUA leu.	UCA ser.	UAA+	UGA+
	UUG leu.	UCG ser.	UAG+	UGG-tri.
C	CUU leu.	CCU pro.	CAU his.	CGU arg.
	CUC leu.	CCC pro.	CAC his.	CGC arg.
	CUA leu.	CCA pro.	CAA glu-N	CGA arg.
	CUG leu.	CCG pro.	CAG glu-N	CGG arg.
A	AUU ileu.	ACU tre.	AAU asp-N	AGU ser.
	AUC ileu.	ACC tre.	AAC asp-N	AGC ser.
	AUA ileu.	ACA tre.	AAA liz.	AGA arg.
	AUG met.	ACG tre.	AAG liz.	AGG arg.
G	GUU val.	GCU ala.	GAU asp.	GGU gli.
	GUC val.	GCC ala.	GAC asp.	GGC gli.
	GUA val.	GCA ala.	GAA glu.	GGA gli.
	GUG val.	GCG ala.	GAG glu.	GGG gli.

Fiecare acid aminic este abreviat sub forma primelor trei litere ale numelui său. Excepţie: glu-N = glutamină, asp-N= asparagină, ileu=izoleucină.
Codonii UAA+, UAG+, UGA+ numiţi respectiv ambră, ocru şi azur sînt codoni non sens, terminali.

Reglarea sintezei proteinelor

Procesul de proteinosinteză, ca de altfel toate procesele metabolice, este supus unor mecanisme de reglare celulară. In celula bacteriană există două tipuri de mecanisme de reglare: mecanisme care reglează sinteza enzimelor şi mecanisme care reglează activitatea lor.

1. Reglarea sintezei enzimatice(reglarea genetică). Acest mecanism a fost explicat prin mai multe ipoteze dar se pare că singura acceptată este cea propusă de Jacob şi Monod.

Sinteza unui metabolit se realizează întotdeauna printr-o succesiune de reacţii catalizate de sisteme enzimatice care intră în acţiune secvenţional.

Fiecare enzimă este dependentă de o genă de structură.

Informaţia genetică înscrisă în ADN genei este transferată ARN_m care o fixează la nivelul ribozomilor, centrii de sinteză, determinînd ordinea acizilor aminici în viitorul lanţ polipeptidice.

Diferitele gene structurale implicate într-un lanţ de reacţii sînt controlate de o genă operator, care va da semnalul de intrare în acţiune a genelor structurale, pentru transcrierea secvenţelor lor nucleotidice în ARN_m. Ansamblul genelor structurale şi a genei operator care le controlează constituie operonul.

Gena operator este ea însăşi sub influenţa unei substanţe citoplasmatice numită represor, a cărui sinteză este guvernată de o altă categorie de gene, gena reglatoare. Represorul se combină cu gena operatoare blocîndu-i activitatea. In această situaţie nu se mai transmite nici o informaţie şi nu se efectuiază nici o sinteză(Fig.nr.45 a şi b).

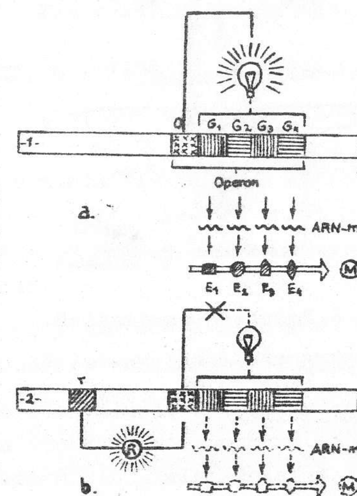


Fig.nr.45. Reglarea sintezei enzimatice.

Reglarea genetică se realizează prin două căi principale: inducţia şi represia.

a) Sistemele inductibile. O enzimă este inductibilă

atunci cînd sinteza ei reclamă prezenţa substratului respectiv. Astfel, în utilizarea (fermentarea) lactozei la Escherichia coli intervin două enzime: α-galactozidaza şi galactozid-permeaza. Sinteza acestor enzime se realizează numai în prezenţa lactozei care reprezintă substratul inductor şi este guvernată de două gene structurale(Z-pentru prima şi Y-pentru a doua) vecine pe cromozomul bacterian. In absenţa lactozei cele două enzime nu sînt sintetizate decît în cantităţi infime, deoarece sinteza lor este represată de un represor care blochează activitatea operonului. In prezenţa lactozei, represorul îşi modifică structura, deoarece intră în legătură cu inductorul(lactoza) şi astfel represia este anulată iar enzimele se sintetizează (Fig.nr.46).

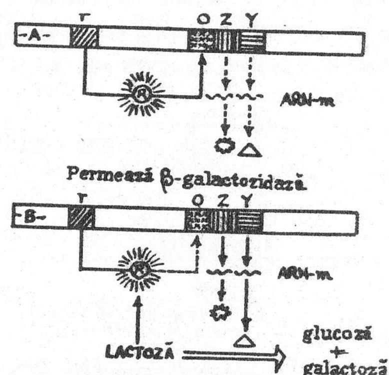


Fig.nr.46.Inducţia enzimatică

Inducţia este proprie reacţiilor catabolice.

b)<u>Sistemele represibile</u>. Represia este caracteristică proceselor de biosinteză. Pentru exemplificare ne vom referi la represia biosintezei triptofanului. Si în acest caz intervin genele de structură care determină sinteza diferitelor enzime ale lanţului de biosinteză şi o genă operator, dar gena reglatoare produce un represor incomplet inactiv,incapabil să se unească cu operatorul şi să-i blocheze activitatea. Pentru ca să devină activ represorul trebuie să se combine cu un co-represor. In cazul sintezei triptofanului,acesta acţio-

nează ca co-represor şi se combină cu represorul care devine activ. Represorul se fixează pe operator şi îi blochează activitatea încît sinteza sistează. Acest sistem de reglare intervine atunci cînd cantitatea de triptofan sintetizată depăşeşte nevoile metabolice ale celulei.(Fig.47).

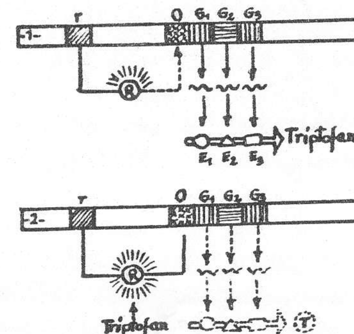


Fig.nr.47.Represia enzimatică.

2.<u>Reglarea activităţii enzimatice</u>

Sistemele genetice de reglare(inducţia şi represia) sînt eficiente dar numai după o perioădă latentă, mai scurtă sau mai lungă. Celulele dispun însă de un mecanism de reglare mai prompt şi imediat eficace, numit reglare alosterică. Enzimele implicate se numesc enzime allosterice. Ele se caracterizează prin:

-sînt inactivate sau inhibate de compuşi numiţi <u>efectori</u>, care nu au nici o analogie structurală cu substratul;

-posedă cel puţin două tipuri de situsuri combinative: situsurile catalitice, prin care se fixează de substrat şi <u>situsurile allosterice</u>, corespunzătoare <u>efectorilor allosterici</u>.

Viteza reacţiei enzimatice, funcţie de concentraţia substratului, se înscrie sub forma unei curbe sigmoide.

In reacţiile de biosinteză enzimele care intervin în primele etape sînt allosterice. Activitatea lor este supusă fenomenului de feed-back (retroinhibiţie) prin produsul final care rezultă din etapa respectivă. Astfel la <u>Escherichia coli</u>.

în cursul metabolismului acidului aspartic, două secvenţe biosintetice duc de la homoserină la l-metionină şi de la l - treonină la l - izoleucină. (Fig.nr.48).Activitatea

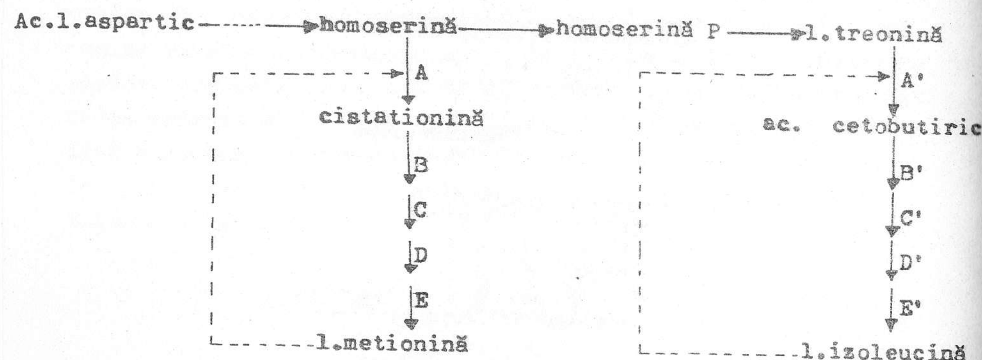


Fig.nr.48.Reglarea prin feed-back.

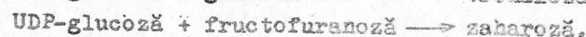
enzimelor allosterice A şi A' este blocată prin produşii finali ai reacţiilor, respectiv de l - metionină şi l-izoleucină şi care, în acest caz, sînt efectori allosterici.

3.4.6.2. Biosinteza oligo-şi polizaharidelor.

Sinteza oligo- şi polizaharidelor constă în cuplarea monozaharidelor prin legături glicozidice. Pentru realizarea legăturii glicozidice este necesar ca unul dintre monozaharide să fie activat, în prealabil, prin legarea de uridindifosfat (UDP). Mai întîi glucoza este fosforilată în poziţia 1,de ATP,cu formare de glucoză-1-fosfat. Reacţia este catalizată de o fosfokinază. Glucoza-1-fosfat reacţionează enzimatic cu UDP rezultînd UDP-glucoză.

UDP-glucoza poate reacţiona cu un alt monozaharid formînd un dizaharid:


UDP-glucoză + glucoză-6-P ——→ trehaloză-6-P.


UDP-glucoză + fructofuranoză ——→ zaharoză.

Biosinteza polizaharidelor pleacă, de asemenea,de la

UDP-glucoză care va fi cuplată cu un lanţ de cel puţin patru unităţi:


G-G-G-G- + UDP-glucoză ——→ G-G-G-G-G- + UDP

Sinteza polizaharidelor(dextrani,levani) este importantă pentru formarea capsulei bacteriene.

3.4.6.3. Biosinteza lipidelor

Sinteza acizilor graşi pleacă de la gruparea acetil a acetil-coenzimei A, care este transferată unei proteine cu moleculă mică ce are funcţia de purtător de acetil numită şi "acil-carrier proteină"(ACP), identificată la Escherichia coli. ACP joacă un rol esenţial în transformările ulterioare. Astfel complexul acetil-ACP format funcţionează ca acceptor pentru unităţi acetil (fragmente cu 2 atomi de C). Fiecare transfer de acetil este însoţit de o reducere. Aceste fragmente cu 2 atomi de C sînt vehiculate de malonil-ACP care rezultă din malonil-coenzima. A. La rîndul ei malonil-CoA derivă din carboxilarea acetil-CoA printr-un proces enzimatic dependent de biotină.(Fig.nr.49).

Fixarea unei unităţi acetil este însoţită de eliberarea unei grupări carboxil libere de la malonil-CoA, sub formă de CO_2, rezultînd β-ceto-acetil-ACP, care apoi va fi redus în acil-ACP printr-o secvenţă de trei reacţii succesive (fig.nr. 49 reacţiile 5,6,şi 7). Repetarea reacţiilor 4,5,6 şi 7 duce la formarea unui lanţ de acid gras cu o lungime din ce în ce mai mare.

Acizii graşi nesaturaţi iau naştere din desaturarea oxidativă a acidului gras corespunzător, saturat. Legătura dublă apare între C_9 şi C_{1o} la acizii graşi cu C_{16} şi între C_{11} şi C_{12} la acizii graşi cu C_{18}.

3.5.Creşterea şi multiplicarea bacteriilor.

3.5.1. Creşterea bacteriilor

Creşterea este definită ca mărimea coordonată a tuturor componenţilor unui organism, ca rezultat al adăugării de substanţă nouă. La organismele pluricelulare creşterea duce la

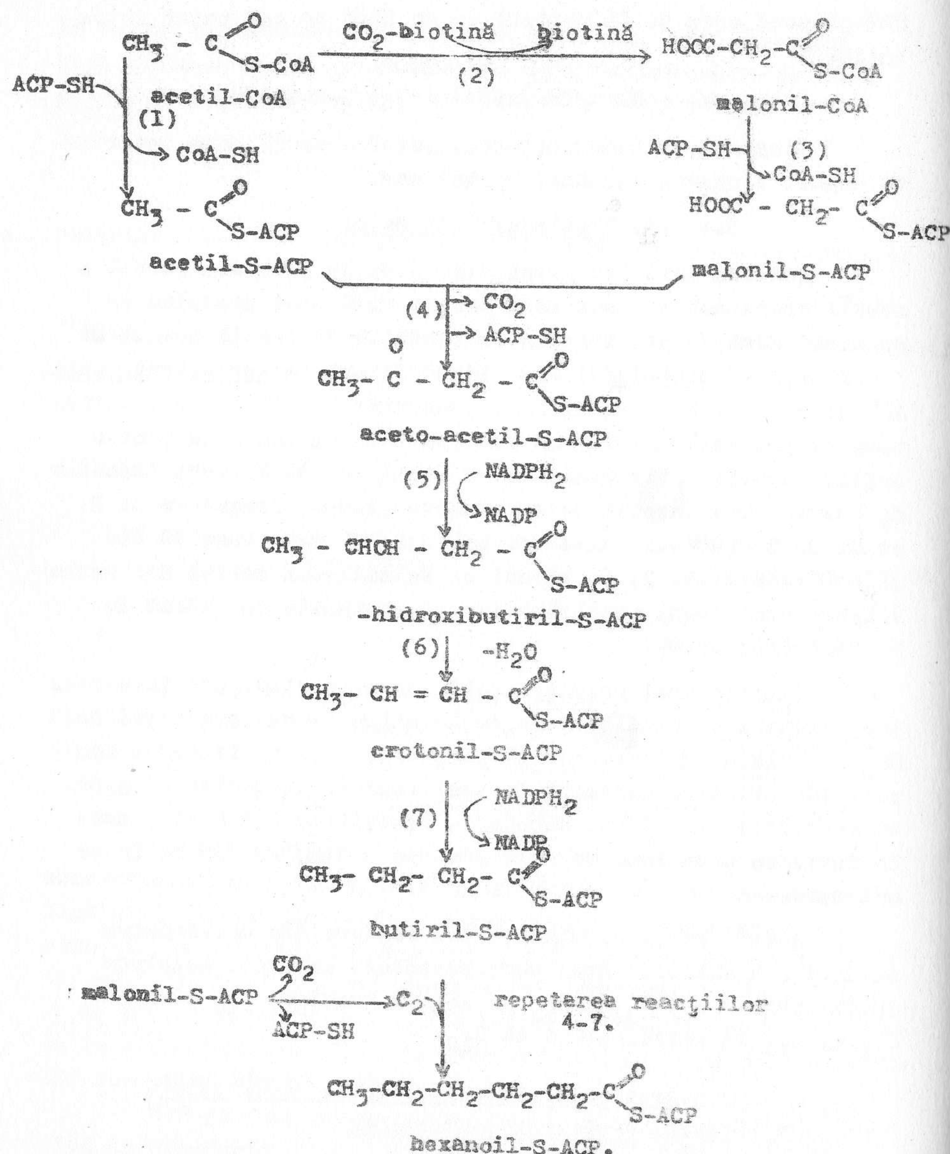


Fig.nr.49.Mecanismul biosintezei acizilor graşi saturaţi,la E.coli.

mărirea taliei. La bacterii, din contra, ea conduce la sporirea numărului de celule.

Creşterea bacteriilor se realizează prin depunerea uni- sau tridimensională a substanţelor nou sintetizate, celula mărindu-se. Creşterea încetează în momentul începerii diviziunii celulare, fenomen determinat, se pare, de modificarea raportului dintre suprafaţa şi volumul celulei. In timpul creşterii acest raport se modifică datorită faptului că suprafaţa creşte la pătrat, iar volumul creşte la cub, ceea ce are drept consecinţă o diminuare a suprafeţei celulare, faţă de volum. Cînd disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un anumit nivel critic, raportul normal se restabileşte prin diviziunea celulei ajunsă la limita ei de creştere.

Diviziunea celulară apare deci ca o formă necesară de reglare automată a activităţii celulei bacteriene.

3.5.2. Multiplicarea bacteriilor

Multiplicarea înseamnă sporirea numărului de indivizi. La marea majoritate a bacteriilor, multiplicarea se face prin diviziune directă (sciziparitate). Există însă un număr mic de specii la care multiplicarea, în mod excepţional, se face prin înmugurire sau ramificare.

3.5.2.1. Multiplicarea prin diviziune (sciziparitate)

Diviziunea constă în scindarea unei celule în două celule surori, egale ca mărime (diviziune izomorfă) sau inegale (diviziune heteromorfă).

La coci diviziunea se face după 1,2, 3 sau mai multe planuri, perpendiculare unele pe altele, ceea ce determină gruparea caracteristică a celulelor rezultate.

Bacilii şi spirilii se divid transversal, după un plan perpendicular pe axul longitudinal al celulei. In mod excepţional, unii spirili se divid după un plan paralel cu axul longitudinal.

Diviziunea celulei este întotdeauna precedată de replica

rea cromozomului bacterian. Replicarea cromozomului şi diviziunea celulei însă nu sînt întotdeauna sincronizate ci există uneori un decalaj, destul de mare, ceea ce determină apariţia celulelor bacteriene multinucleate.

După **Bisset**, la bacterii, diviziunea s-ar producde după două mecanisme diferite, funcţie de apartenenţa bacteriilor la tipul "S" sau "R"+). Bacteriile de tip S s-ar divide prin strangulare, în timp ce bacteriile de tip R, prin apariţia unui sept transversal.

Knaysi, consideră însă că diviziunea se realizează printr-un mecanism unic, în trei etape succesive.(Fig.nr.5o).

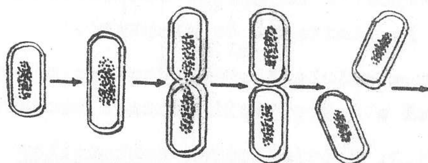


Fig.nr.50.Reprezentarea schematică a multiplicării prin diviziune simplă (sciziparitate).

-apariţia unui spt transversal format de membrana citoplasmatică ce împarte conţinutul celular în două;

-invaginarea peretelui celular la nivelul septului transversal şi pătrunderea lui centripetă, cu separarea septului în două foiţe. Celulele surori astfel formate, în această etapă de diviziune, vor avea toţi constituienţii proprii dar peretele celular va fi comun;

-separarea celulelor surori prin scindarea peretelui celular comun. In unele cazuri,celulele surori rămîn legate între ele prin septul transversal deoarece peretele celular transversal nu se formează complet.

+)Bacteriile de tip "S"(smouth)formează pe mediile de cultură solide colonii rotunde,netede,cu margini regulate şi uşor detaşabile de pe substrat.Bacteriile de tip"R"(rough)pe medii solide formează colonii rugoase,aspre,neregulate,aderente de substrat.Apartenenţa la tipul S sau R presupune şi unele particularităţi funcţionale.

3.5.2.2.Multiplicarea prin ramificare şi înmugurire

Acest tip de multiplicare, întîlnit la *Rhodomicrobium vannielli* (fam.Athiorhodaceae), constă în formarea pe suprafaţa celulei a unui mugure terminal sau lateral, care va deveni o nouă celulă ce rămîne legată de celula mamă printr-un tub de legătură, la nivelul căruia apre septul transversal. (Fig.nr.51).

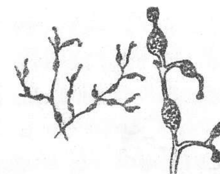


Fig.nr.51.Multiplicarea prin înmugurire şi ramificare.

Celulele rezultate prin înmugurire prezintă uneori tendinţa de a rămîne ataşate de celulele mamă formînd colonii cu celule unite prin ramificaţiile lor tubulare.

La *Hyphomycrobium vulgare*,celulele dau naştere la o prelungure filamentoasă (hifă)la capătul căreia se formează, prin înmugurire, o nouă celulă ce se poate desprinde sau rămîne ataşată, prin "hifă" de celula mamă.

3.5.3. Aspectele cantitative ale creşterii bacteriene.

Deoarece, la bacterii, creşterea duce la sporirea numărului de indivizi ea poate fi considerată sinonimă cu multiplicarea.

Aspectele cantitative ale creşterii, de mare importanţă teoretică şi practică, pot fi studiate după însămînţarea bacteriilor pe un mediu de cultură lichid.

Cercetarea aspectelor cantitative ale creşterii se poate face pe culturi sau populaţii bacteriene dezvoltate în medii de cultură lichide. Pe mediile solide bacteriile se dezvoltă sub formă de colonii care nu se pretează la astfel de cercetări cantitative.

3.5.3.1.Expresia matematică a creşterii

Creşterea unei populaţii(culturi) bacteriene se poate defini prin două constante:

a)durata unei generaţii (G) sau timpul dintre două diviziuni succesive;

b)rata de creştere (μ) sau numărul de diviziuni pe unitatea de timp (t).

Durata unei generaţii este relativ uşor de calculat. Astfel, în condiţii în care multiplicarea este optimă, se poate considera că un anumit număr de celule bacteriene însămînţate (a) va da:

-după o singură diviziune $a = 2.a.$

-după două diviziuni $a = 2.2a$ sau $2^2a.$

-după n diviziuni $x = 2^n a.$

Creşterea numărului de celule se face exponenţial sau logaritmic, funcţie de timp şi de numărul de diviziuni(Tabel nr.18).

Tabel nr.18

Creşterea exponenţială a unui microorganism unicelular cu durata generaţiei de 20 minute.

Timpul în minute	Numărul de diviziuni	Numărul de celule exprimat: Aritmetic	Log_2	Log_{10}
0	0	1	0	0,000
20	1	2	1	0,301
40	2	4	2	0,602
60	3	8	3	0,903
80	4	16	4	1,204
100	5	32	5	1,505
120	6	64	6	1,806
140	7	128	7	2,107
160	8	256	8	2,408
180	9	512	9	2,709
200	10	1024	10	3,010

După n diviziuni, în intervalul de timp "t" se vor forma un număr de celule, notat b.

Dacă a este numărul iniţial de celule (numărul de celule însămînţate, iar b numărul de celule după n diviziuni la timpul t, atunci numărul de diviziuni n produse în intervalul de timp t este dat de formula:

$$n = \frac{\log b - \log a}{\log .2}$$

Cunoscînd valoarea lui n se poate calcula durata unei generaţii: $G = \frac{t}{n}$. Valoarea lui G nu este aceeaşi pentru toate speciile. De exemplu la Escherichia coli G = 20 minute ($\frac{60}{3}$) în timp ce la Mycobacterium tuberculosis G $\doteq$ 800-900 minute.

Rata de creştere (μ) sau numărul de diviziuni pe unitatea de timp, rezultă din formula: $\mu = \frac{n}{t}$.

Intrucît rata de creştere, după J.Monod, exprimă activitatea biosintetică a celulei bacteriene, se poate considera că ea corespunde vitezei de creştere. Rata de creştere sporeşte progresiv după însămînţare şi rămîne constantă pe toată durata multiplicării active. Pentru Escherichia coli, la care G = 20 minute, $\mu = 3\ (\frac{3}{1})$, iar pentru Mycobacterium tuberculosis $\mu = 0,075$.

3.5.3.2.Curba de creştere sau evoluţia unei populaţii bacteriene

Intr-o cultură nereînnoită, o populaţie bacteriană nu-şi poate menţine mult timp creşterea exponenţială, deoarece aceasta este în mod normal, limitată de doi factori: epuizarea substanţelor nutritive din mediu şi acumularea substanţelor toxice rezultate din metabolism, ambii consecinţă a multiplicării bacteriilor.

Teoretic, o celulă bacteriană cu durata de generaţie de 20 minute, ar putea produce în 48 ore de creştere exponenţială 2^{144} celule, ceea ce ar reprezenta o biomasă de 2.10^{28} tone, respectiv 4000 ori greutatea planetei noastre. Dar, fiecare populaţie bacteriană îşi autoreglează creşterea datorită factorilor limitanţi mai sus menţionaţi, astfel că evoluţia ei

se face după o curbă de creștere tipică. O astfel de curbă, numită curba de creștere a unei culturi bacteriene (Fig.nr.52)

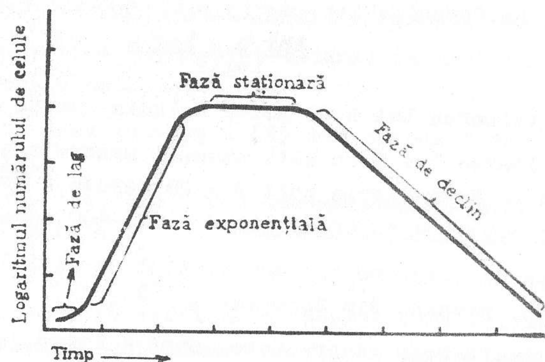


Fig.nr.52.Curba de creștere la bacterii.

se construiește reprezentînd numărul de bacterii pe unitate de volum, funcție de timp. La ea se pot distinge patru faze principale, caracterizate de valoarea ratei de creștere. Acestea sînt:

1.Faza de lag sau de latență, în care rata de creștere este zero ($\mu = 0$).

2.Faza de creștere exponențială (logaritmică) cînd rata de creștere este maximă și constantă (μ = max).

3.Faza staționară sau a maximului staționar, rata de creștere fiind din nou zero.

4.Faza de declin cînd rata de creștere diminuează($\mu < 0$)

Intre faza 1 și 2 se interpune o etapă de accelerare a ratei de creștere, iar faza 2 și 3 o etapă de diminuare a valorii lui μ .

Faza de lag(latență). După însămînțarea unui mediu de cultură lichid, convenabil, cu un număr de celule bacteriene, dezvoltarea culturii se observă abia după 2 sau 3 ore. Acest interval de timp în care rata de creștere este nulă, poartă numele de fază de lag sau de latență.Ea poate fi observată la cultivarea tuturor microorganismelor.

Factorii care determină faza de lag,sînt:

a)Vîrsta bacteriilor inoculate. In cazul însămînțării celulelor tinere, de cîteva ore, într-un mediu nou, faza de lag este extrem de scurtă. Din contra, faza de lag este lungă dacă celulele însămînțate provin dintr-o cultură în fază staționară sau de declin. In faza de lag un număr important de celule însămînțate pot să moară iar celulele rămase vii se găsesc într-o stare fiziologică puțin favorabilă, metabolismul lor fiind tulburat și compoziția lor chimică modificată.Aceasta presupune restaurarea și reînnoirea mecanismelor biosintetice.

b)Adaptarea bacteriilor. In cazul însămînțării celulelor bacteriene tinere, din faza exponențăală, într-un mediu nou cu o compoziție identică, ele se multiplică spontan, fără o fază de latență. Dacă compoziția noului mediu este diferită, faza de lag apare și ea este determinată de absența enzimelor necesare pentru utilizarea noilor substanțe și de necesitatea sintezei lor. In situația în care noul mediu de cultură este total diferit, ca compoziție, de mediul din care provin bacteriile însămînțate, atunci marea majoritate a celulelor nu se pot multiplica pentru că nu găsesc factorii de creștere indispensabili, iar faza de larg este foarte lungă.

2.Faza exponențială sau logaritmică, urmează fazei de latență și se caracterizează prin multiplicarea continuă a bacteriilor.Rata de creștere la început se mărește progresiv și apoi este maximă și constată, ceea ce înseamnă că durata generației este minimă. Grafic această fază se traduce printr-o dreaptă care exprimă o proporționalitate riguroasă între numărul de celule și viteza(rata) de creștere.Panta dreptei este determinată de rata de creștere (μ) dependentă de condițiile de mediu (temperatură,pH, natura și concentrația substratului nutriviv). De exemplu, la Escherichia coli, bacterie mezofilă, rata de creștere este de 0,5 la 18°C și de 3,3 la 40°C. La bacteriile termofile panta dreptei este mai acentuată, iar la cele psihofile este mult mai domoală(Fig.nr.53). Spre sfîrșitul fazei exponențiale rata de creștere diminuează.

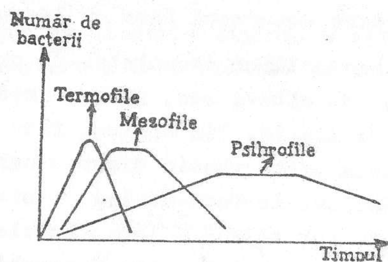


Fig.nr.53.Rata de creştere la bacteriile termofile,mezofile şi psihrofile.

Durata fazei exponenţiale este de cîteva ore.

3. Faza staţionară. La sfîrşitul fazei exponenţiale mediul de cultură este mai puţin favorabil creşterii(diminuarea substanţelor nutritive şi acumularea produşilor de metabolism), iar numărul celulelor vii rămîne constant. Este momentul în care începe faza staţionară caracterizată de realizarea numărului maxim de celule pe ml.de mediu. Există,prin urmare, un echilibru între numărul celulelor care mor şi cel al celulelor rezultate din diviziune. Multiplicarea bacteriilor în faza staţionară nu încetează dar ea se limitează doar la înlocuirea celulelor moarte, ceea ce înseamnă că rata de creştere devine din nou nulă ($\mu = 0$).

4.Faza declin. Faza staţionară durează, funcţie de specie şi de condiţiile de cultură, de la cîteva ore pînă la cîteva zile, după care numărul celulelor vii diminuiază treptat. Cultura intră astfel în faza de declin, caracterizată printr-o rată de mortalitate constantă. Bacteriile moarte autolizează şi uneori celulele rămase vii se mai pot multiplica pe baza substanţelor nutritive rezultate din autoliză, dar fenomenul este sporadic. Cultura sfîrşeşte prin moartea tuturor celulelor şi autosterilizarea ei.

Creşterea unei culturi bacteriene este influenţată de aceiaşi factori care influenţează şi nutriţia: temperatura, natura şi concentraţia substratului nutritiv. Influenţa temperaturii asupra ratei de creştere şi a producerii de biomasă

poate fi urmărită în tabelul nr.19.

Tabel nr.19

Influenţa temperaturii asupra ratei de creştere şi a producerii de biomasă,la Aerobacter aerogenes cultivat în aerobioză,pe un mediu sintetic cu glucoză.

Temperatura °C	Rata de creştere(μ)	Producerea de biomasă gr(greutate uscată)de celule pe gr.glucoză.
23	0,552	0,354
27	0,751	0,356
32	0,967	0,336
37	1,305	0,324
38,8	0,833	0,217
39,7	0,600	0,172
40,8	0,400	0,095
42	0	0

Natura substratului nutritiv este importantă şi poate modifica rata de creştere. Astfel Bacillus subtilis cultivat pe un mediu sintetic cu citrat ca sursă de carbon şi energie, are rata de creştere 0,3, iar în bulion nutritiv de 2.

In ce priveşte concentraţia substratului, aceasta poate avea rol de factor limitant, în sensul că rata de creştere sporeşte proporţional cu concentraţia substratului pînă la o valoare fixă care este egală cu rata de creştere exponenţială.

3.5.3.3.Creşterea continuă(culturi continue)

Am văzut că, în condiţii de cultură obişnuite, faza de creştere exponenţială nu poate dura decît cîteva ore,deoarece mediul se epuizează relativ repede în substanţe nutritive, îmbogăţindu-se în produşi toxici de metabolism, ceea ce diminuiază sau chiar anulează rata de creştere.

Pentru producerea unor mari cantităţi de celule microbiene(biomasă) în scopuri industriale sau numai de cercetare, este important ca faza de creştere exponenţială să fie cît mai lungă.Aceasta se poate realiza daca mediul de cultură

este continuu reînnoit odata cu eliminarea produşilor de metabolism. Aparatele în care se realizează astfel de culturi se numesc chemostate. Schema simplificată a unui chemostat este prezentată în fig.nr.54.

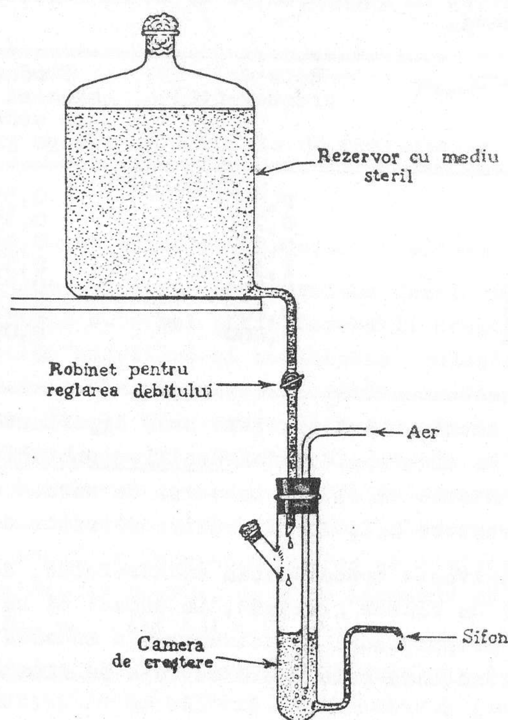


Fig.nr.54. Chemostat

Intr-un astfel de sistem în care cultura rămîne în volum constant (aprovizionarea cu mediu nou este astfel reglată încît să corespundă exact cu volumul de mediu vechi care se scurge prin sifonul de evacuare a vasului de cultură) concentraţia variază în funcţie de rata de creştere a speciei respective.şi de rata de diluţie (D) determinată de aportul de mediu nou. Variaţia globală a populaţiei bacteriene poate fi exprimată matematic prin:

$\frac{dN}{dt} = (\mu - D) N$ în care:

N = concentraţia celulară iniţială;
μ = rata de creştere;
D = rata de diluţie;
t = timpul

In cazul cînd valoarea lui μ este maximă şi constantă (faza exponenţială) pot fi luate în discuţie 3 eventualităţi:

1. μ max. < D, respectiv rata de diluţie este mai mare decît rata de creştere. In acest caz populaţia tinde spre zero deoarece celulele nu pot compensa prin diviziune diluarea culturii de către mediul proaspăt: $\frac{dN}{dt} < 0$.

2. μ max.= D.In acest caz rata de diluţie este astfel aleasă încît populaţia rămîne într-o creştere continuă,constantă: $\frac{dN}{dt} = 0$.

3. μ max > D, sau rata de diluţie este inferioară ratei de creştere: $\frac{dN}{dt} > 0$. Populaţia tinde să crească ceea ce duce la epuizarea substanţelor nutritive din mediu şi în consecinţă la o diminuare a ratei de creştere.

3.5.3.4. <u>Creşterea sincronă(culturi sincrone)</u>

Intr-o cultură bacteriană nu toate celulele se divid în acelaşi timp (sincron) şi deci nu toate vor avea aceeaşi vîrstă. Pentru studii morfologice, fiziologice şi biochimice este însă important să se lucreze pe celule de aceeaşi vîrstă, respectiv pe celule care se divid sincron.

Obţinerea unei culturi sincronizate se poate realiza prin schimbarea proprietăţilor fizico-chimice ale mediului. Practic principalul mijloc de realizare a culturilor sincrone este supunerea populaţiei bacteriene la schimbări ciclice de temperatură. Astfel dacă o populaţie bacteriană în plină multiplicare (<u>Salmonella typhimurium</u>) este supusă alternativ, pentru perioade determinate de timp,la temperatura optimă de dezvoltare (37°C) şi la o altă temperatură mai coborîtă(25°C) întreaga populaţie se va divide sincron în timpul scurtei incubări la 37°.

In timpul incubării la 25°C populaţia rămîne constantă deoarece multiplicarea nu are loc la această temperatură. Curba creşterii sincrone are aspectul celei din figura nr.55.

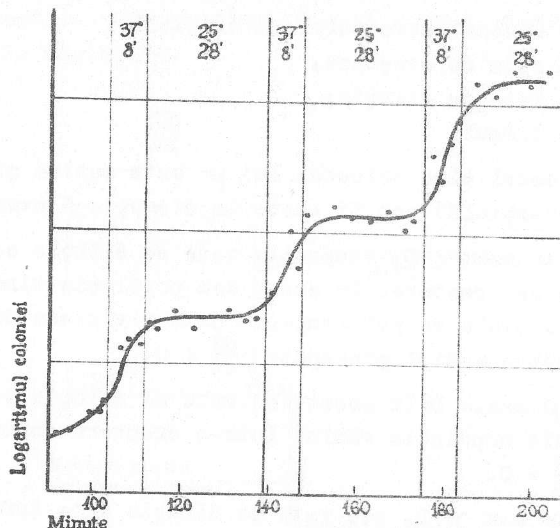


Fig.nr.55. Curba creşterii sincrone.

3.6.Culturile şi coloniile bacteriene

Cultivarea bacteriilor se poate face pe medii lichide şi solide.

In medii lichide aspectul culturilor bacteriene este diferit în funcţie de specia bacteriană şi de proprietăţile fizico-chimice ale mediului.

Unele specii bacteriene, cultivate în bulion nutritiv, tulbură uniform mediul (Staphylococcus aureus); altele tulbură bulionul formînd unde mătăsoase(Escherichia coli).Tulburarea mediului poate să dispară mediul devenind clar dar prezentînd un depozit floconos(Streptococcus,Bacillus anthracis) sau vîscos (Streptococcus faecalis).

Alte specii nu tulbură mediul de cultură ci se dezvoltă la suprafaţa lui formînd o peliculă sau un văl. Acest văl poate fi subţire şi fragil(Corynebacterium diphteriae),compact

şi plisat (Bacillus subtilis,Bacillus mesentericus),gros şi gofrat (Mycobacterium tuberculosis) sau vîscos(Pseudomonas aeruginosa). Există specii care formează la suprafaţa mediului lichid un inel (Klebsiella pneumoniae).

Aceste aspecte ale culturilor sînt valabile pentru bulionul nutritiv, după o incubare de 24-48 ore la temperatura optimă. Aspectul culturilor vechi se modifică.

Cultivate pe medii solide(bulion gelozat),bacteriile se dezvoltă sub formă de colonii, cu diametrul de unu pînă la cîţiva mm. O astfel de colonie este rezultatul creşterii şi multiplicării uneia sau a cîtorva celule aparţinînd aceleiaşi specii sau tulpini bacteriene. Colonia deci reprezintă o populaţie celulară. Structura şi aspectul său exterior sînt determinate de morfologia celulelor componente, de modul lor de grupare precum şi de proprietăţile mediului de cultură sau acţiunea factorilor fizico-chimici(Fig.nr.56).

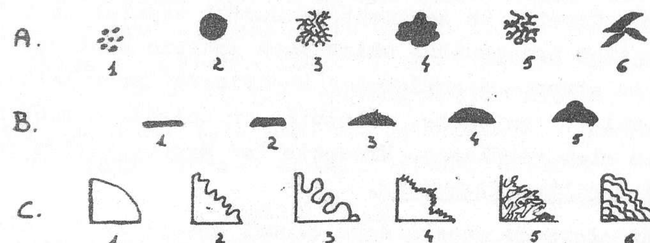


Fig.nr.56.Caracteristicile coloniilor bacteriene
A)forma coloniilor: 1,punctiformă; 2.circulară; 3.filamentoasă; 4.neregulată; 5.rizoidă; 6.fusiformă.
B)profilul coloniei: 1.plat; 2.ridicat; 3.convex; 4.pulvinat; 5.umbonat.
C)marginile coloniei: 1.întregi; 2.ondulate; 3.lobate; 4.erodate;5.filamentoase;6.buclate.

După aspectul morfologic determinat, aşa cum am văzut, de particularităţile morfo-funcţionale ale celulelor aparţinînd unei anumite tulpini sau specii, la bacterii au fost descrise două tipuri esenţiale de colonii: S(smouth=netede) şi R (rough=rugoase).

Coloniile de tip S, sînt netede, bombate, cu suprafaţa strălucitoare şi cu marginile regulate. Sînt formate din celule izolate, dispuse în diplo sau lanţuri scurte. Se desprind uşor de pe substrat şi introduse în soluţie salină izotonică NaCl 8,5‰)formează suspensii omogene. Bacteriile care pe mediii solide formează astfel de colonii, cultivate în bulion tulbură uniform mediul In cazul speciilor capsulate, celulele prezintă capsulă. La speciile patogene,tulpinile cu colonii de tip S sînt virulente şi prezintă o structură antigenică completă.

Coloniile de tip R sau rugoase, sînt turtite, cu suprafaţa zbîrcită, aspră, cu margini neregulate, dinţate. De regulă, sînt formate din lanţuri încolăcite de celule. Aderă strîns de substrat şi nu se desprind uşor. Astfel de bacterii, în soluţie salină izotonică aglutinează spontan. In bulion se dezvoltă greu formînd un sediment pe fundul vasului de cultură. Celulele sînt necapsulate chiar dacă aparţin unei specii capsulate. Au structură antigenică modificată(incompletă). In cazul speciilor patogene, tulpinile cu colonii R sînt nevirulente sau slab virulente. Excepţie fac *Mycobacterium tuberculosis* şi *Bacillus anthracis*.

In afară de aceste două tipuri esenţiale de colonii,la bacterii au mai fost descrise şi colonii mucoase sau de tip M precum şi colonii mobile.

Coloniile M(mucoase)sînt de fapt colonii de tip S dar celulele care le constituie sînt capsulate. Substanţele capsulare dau coloniilor o consistenţă mucoasă-vîscoasă,cu tendinţa de a se întinde pe mediu.

Coloniile mobile sînt acelea care, datorită aparatului flagelar puternic al celulelor constituiente,se pot deplasa pe suprafaţa mediului printr-o mişcare de rotaţie levogiră sau de translaţie. Sînt întîlnite numai la bacilii mobili cu spori deformanţi(*Bacillus circulans*,*Bacillus alvei*,*Bacillus sphaericus var.rotans*).

Bacteriile anaerobe, cultivate în profunzimea mediilor solide, pot forma trei tipuri de colonii profunde:

a)lenticulare-biconvexe(*Clostridium perfringens*);
b)pufoase-(*Clostridium sporogenes*);
c)arborescente-(*Clostridium septicum*);

3.7.Acţiunea factorilor de mediu asupra bacteriilor

Creşterea,multiplicarea şi activitatea biologică normală a bacteriilor sînt dependente de condiţiile de mediu. Fiind, în general, mai rezistente la acţiunile nefavorabile ale agenţilor fizici şi chimici, decît organismele superioare,bacteriile se caracterizează printr-o mare capacitate de adaptare la cele mai variate condiţii de mediu.

3.7.1.ACTIUNEA Agenţilor fizici.

3.7.1.1.Temperatura

Temperatura este un factor esenţial în dezvoltarea bacteriilor. Limitele temperaturilor de dezvoltare, sau eugenezice, pentru unele specii, numite stenoterme, sînt foarte restrînse. Pentru cele mai multe specii,numite euriterme, aceste limite sînt foarte largi. Intre limitele temperaturilor eugenezice sînt cuprinse temperaturile: minimă, optimă şi maximă, de dezvoltare. Funcţie de aceste temperaturi bacteriile se împart în trei categorii(Tabel nr.2o):

Tabel nr.2o

Clasificarea bacteriilor după temperaturile de dezvoltare.

Tipul de bacterii	Temperaturile eugenezice °C		
	Minimă	Optimă	Maximă
Criofile	- 5	+ 10 - + 20	+ 30
Mezofile	10 - 15	25 - 40	50
Termofile	40 - 45	50 - 55	60 - 80

a)Bacteriile criofile îşi au habitatul obişnuit în ape şi sol. Cele mai multe aparţin genurilor: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligens*. *Micrococcus*. Unele specii sînt agenţi de contaminare a unor produse alimentare (carne, peşte, lapte, fructe) conservate la 0°C.

b)Bacteriile mezofile sînt majoritatea speciilor sapro-

fite şi cele patogene pentru om şi animalele homeoterme.

c)Bacteriile termofile se întîlnesc, obişnuit, în apele termale, în solurile cultivate şi îngrăşate cu bălegar şi în gunoiul de grajd, de unde adesea contaminează laptele. Limita termică superioară de dezvoltare a bacteriilor termofile este la 90°C deşi în unele izvoare termale din Islanda au fost întîlnite şi în ape cu temperatura de 98°C.

Temperaturile inferioare celor eugenezice sînt, în general, suportate de către bacterii. La aceste temperaturi ele nu se multiplică dar îşi conservă nealterate toate proprietăţile, inclusiv virulenţa în cazul celor patogene. Temperaturile moderat scăzute determină o diminuare a metabolismului cu 50% pentru fiecare scădere de 10°C. Acest fenomen prezintă importanţă în conservarea culturilor bacteriene. Astfel la temperaturi cuprinse între 2 şi 8°C bacteriile rămîn într-o stare de semilatenţă şi pot fi conservate timp îndelungat.

Temperaturile foarte scăzute sînt greu suportate de bacterii deoarece în cursul procesului de îngheţare apa cristalizează fie extraceluler (îngheţare lentă) fie intracelular (îngheţare rapidă) ceea ce alterează structura citoplasmei. Numai o îngheţare ultrarapidă împiedică cristalizarea apei şi determină trecerea ei într-o stare amorfă, vitroasă. Pe acest principiu se bazează liofilizarea, metodă de conservare îndelungată a microorganismelor. Liofilizarea constă în supunerea unei suspensii celulare la acţiunea unor temperaturi foarte scăzute sub vid. Aparatele în care se realizează aceste operaţiuni se numesc liofilizatoare.

Congelările şi decongelările repetate, chiar dacă nu se fac la temperaturi foarte coborîte, sînt nocive deoarece ele duc la ruperea membranelor celulare.

Temperaturile superioare celor eugenezice sînt letale pentru majoritatea microorganismelor în stare vegetativă. De multe ori este suficientă o creştere de numai 10-15°C peste temperatura eugenezică maximă, pentru ca bacteriile să fie omorîte. Efectul bactericid al căldurii se datoreşte denaturării proteinelor celulare, fenomen ireversibil.

Acţiunea temperaturilor înalte depinde de starea fiziologică a celulelor şi de numărul lor. In soluţii apoase, aproape toate bacteriile, în stare vegetativă, sînt omorîte la 100°C. In mediu uscat însă bacteriile sînt mai rezistente, supravieţuind pînă la 60 minute la 130°C. In general, însă, formele vegetative ale bacteriilor sînt omorîte prin încălzirea lor la 60°C timp de 30 minute, în medii apoase. Sporii bacterieni sînt mult mai rezistenţi.

Distrugerea termică a celulelor bacteriene este un fenomen exponenţial în funcţie de timp. Intr-un timp dat(t) se distruge 90% din populaţia bacteriană, pentru ca apoi în aceeaşi perioadă de timp să se distrugă 90% din populaţia rămasă viabilă. Intotdeauna trebuie să se ţină însă seama de apariţia formelor termorezistente. Cu cît populaţia supusă acţiunii termice este mai numeroasă cu atît numărul formelor termorezistente va fi mai mare. Aceste fenomene sînt deosebit de importante din punct de vedere practic, în sterilizare.

3.7.1.2.<u>Radiaţiile</u>

Se cunoaşte de multă vreme că radiaţiile solare, în special ultravioletele(UV) au importante proprietăţi bactericide, fiind principali agenţi naturali de sterilizare. Absenţa microorganismelor în pelicula superficială a apelor se datoreşte radiaţiile solare.

Principalele tipuri de radiaţii sînt: electromagnetice şi sonice.

a)<u>radiaţiile electromagnetice</u>, sînt caracterizate de lungimea lor de undă. Deosebim:

-radiaţii cosmice cu	= 0,0001	- 0,01 Å.
-radiaţii γ	= 0,01	- 1 Å.
-radiaţii X	=	- 100 Å.
-radiaţii ultraviolete	= 100	- 4000 Å.
-spectrul vizibil	= 4000	- 6000 Å.
-radiaţii roşii	= 6000	- 50.000 Å.
-radiaţii infraroşii	= 50.000 Å	- 1 cm.
-undele hertziene	= 1 cm	- 545 m.

Studiul acţiunii radiaţiilor electromagnetice asupra microorganismelor prezintă un dublu interes, deoarece pe de o parte ele sînt agenţi sterilizanţi, iar pe de altă parte cunoaşterea modului lor de acţiune asupra bacteriilor poate furniza indicaţii preţioase despre acţiunea asupra celulei umane. Aceasta cu atît mai mult cu cît trăim într-o epocă în care cercetările spaţiale obligă omul să intre în contact cu numeroase tipuri de radiaţii.

Cantitatea de energie cedată de o radiaţie unui organism viu (cuantumul de energie) rezultă din formula:

$$W = \frac{C}{\lambda}$$

în care W = cuantumul de energie;
C = viteza luminii
λ = lungimea de undă

şi va fi cu atît mai mare cu cît lungimea de undă este mai mică.

Radiaţiile X şi γ eliberînd o cantitate mare de energie şi avînd o mare putere de penetraţie, au efect bactericid puternic. Utilizarea lor ca agenţi sterilizanţi este însă limitată de preţul ridicat al instalaţiilor de producere a radiaţiilor precum şi de acţiunea asupra substanţelor înconjurătoare pe care le denaturează sau le distruge, ele fiind radiaţii ionizante.

Cele mai utilizate ca agenţi antimicrobieni sînt radiaţiile ultraviolete (UV), deşi au un efect bactericid mai mic şi o putere de pătrundere mai slabă. In practică se utilizează UV cu lungimea de undă de 2600-2700 Å. Efectul lor depinde de durata iradierii şi de intensitatea radiaţiilor.

Efectul bactericid al UVse explică prin teoria "ţintei", în conformitate cu care acesta se exercită prin intermediul ADN. Radiaţiile UV ar lovi direct ADN determinînd reacţii fotochimice selective cu bazele din structura lui.

O acţiune bactericidă puternică o are şi laserul. Laserul este un fascicol foarte concentrat şi puternic de cuante luminoase sau fotoni, generat de obicei de un cristal de rubin, ca urmare a "excitaţiei" atomilor de crom din cristal, produsă prin modificarea stării lor energetice sub acţiunea

luminii emise de o lampă cu xenon. Laserul emite o lumină coerentă, sub forma unui fascicol de radiaţii cu lungime de undă uniformă, cuprinsă între 3000 şi 9000 Å. Laserul acţionează intens şi localizat concentrînd o energie enormă pe o suprafaţă infimă, strict circumscrisă. El distruge microorganismele instantaneu.

3.7.1.3. <u>Presiunea</u>

Presiunea poate acţiona asupra microorganismelor ca presiune osmotică sau ca presiune hidrostatică.

a) <u>Presiunea osmotică</u>. Membrana citoplasmatică a bacteriilor fiind semipermiabilă nu îşi poate menţine caracterul de selectivitate decît în condiţiile unei presiuni osmotice, a mediului, egală sau aproape egală cu cea a conţinutului celular (izotonism). Numai mediile izotonice permit desfăşurarea normală a vieţii celulelor. Orice modificare a presiunii osmotice a mediului, fie într-un sens fie în altul, va provoca tulburări fiziologice şi morfologice în celula bacteriană, care vor fi cu atît mai profunde cu cît variaţiile presiunii osmotice sînt mai mari.

In mediile hipertonice, în conformitate cu legile osmozei, celulele pierd apa, se deshidratează, protoplasma se desprinde de pe peretele celular şi apare fenomenul de plasmoliză.

In mediile hipotonice, în virtutea aceloraşi legi, celulele se hidratează, se tumefiază (fenomenul de plasmoptiză) şi în final lizează.

Atîta vreme cît variaţiile de presiune osmotică nu sînt mari şi permanente, fenomenele sînt reversibile. Mediile puternic hiper sau hipotonice omoară bacteriile.

Sensibilitatea bacteriilor faţă de variaţiile presiunii osmotice a mediului diferă funcţie de specie şi de vîrsta celulelor. Bacteriile halofile suportă presiuni osmotice foarte mari iar celulele tinere sînt mai sensibile decît celulele bătrîne.

b) <u>Presiunea hidrostatică</u>. Celulele bacteriene suportă,

în general, presiuni hidrostatice destul de mari dar rezistența lor la acțiunea presiunilor înalte variază funcție de habitatul lor natural precum și de starea fiziologică. Este știut că sporul bacterian este de aproximativ două ori mai rezistent decît celula vegetativă.

Bacteriile telurice își diminuiază ritmul de multiplicare la presiuni de 300 atmosfere iar la 600 sînt omorîte.

Cercetările efectuate pe Escherichia coli au arătat că la 200 - 500 atmosfere, celulele devin filamentoase și nu se mai multiplică. Fenomenul este explicat de ZoBell prin blocarea replicării ADN.

Bacteriile de pe fundul mărilor și oceanelor, sau cele din pînzele petroliere, se dezvoltă în mod normal la presiuni hidrostatice foarte mari. De exemplu, Bacterium thalassokoides și Bacterium submarinus, izolate din sedimentele oceanice de la 10.500 m, se dezvoltă la 1000-1400 atmosfere. Acestea se numesc bacterii barofile.

3.7.1.4. Ultrasunetele.

O suspensie bacteriană densă, supusă, acțiunii ultrasunetelor se limpezește, ceea ce înseamnă că celulele au fost dezintegrate iar componenții lor chimici au fost puși în libertate. Dezintegrarea celulelor bacteriene sub acțiunea ultrasunetelor prezintă importanță pentru cercetările de chimie și biochimie bacteriană, deoarece metoda permite obținerea unor complexe chimice care își păstrează structura avută în celulă.

Acțiunea nocivă a ultrasunetelor se datorește fenomenului de "cavitație", de creiere a unor cavități în continuitatea fazei lichide a citoplasmei, în care gazele puternic activate de ultrasunete realizează presiuni considerabile ce rup membranele celulare. Este demonstrat faptul că bacteriile uscate au o mare rezistență la ultrasunete.

Sensibilitatea bacteriilor la ultrasunete variază funcție de specie. După Grabar și Royer (1945) Bacillus anthracis este cel mai sensibil iar Mycobacterium tuberculosis cel mai rezistent, Sporii sînt mai rezistenți decît formele vegetative dar și ei pot fi distruși printr-o expunere mai îndelungată(Elpiner 1952).

Ultrasunetele inactivează și toxinele bacteriene,virusurile ș.a. Activitatea distructivă a ultrasunetelor își găsește aplicarea practică în sterilizarea unor lichide(lapte) sau în transformarea unor bacterii în vaccinuri.

3.7.2. Acțiunea agenților chimici

Din punct de vedere al acțiunii asupra celulelor bacteriene substanțele chimice se împart în două mari categorii:

-substanțe care influențează creșterea și dezvoltarea bacteriilor;

-substanțe indiferente.

Substanțele din prima categorie, la rîndul lor,pot fi împărțite în:

-substanțe stimulatoare(elementele nutritive și factorii de creștere);

-substanțe inhibitorii,nocive.

Din această ultimă categorie fac parte substanțele antiseptice și dezinfectante.

Substanțele antiseptice sînt substanțele care împiedică creșterea și multiplicarea bacteriilor, dar nu le omoară. Ele au o acțiune bacteriostatică și se mai numesc substanțe bacteriostatice.

Substanțele dezinfectante distrug celulele bacteriene. Avînd acțiune bactericidă se mai numesc substanțe bactericide.

Deși se face distincție între aceste două tipuri de substanțe, dese ori între ele există deosebiri numai în ce privește concentrația folosită. De exemplu, fenolul în concentrații de 2-5% este dezinfectant iar în concentrații de 0,02-0,05% este antiseptic.

Mecanismele de acțiune ale agenților chimici sînt extrem de diverse. Cu toate acestea se pot delimita, în linii mari, trei mecanisme: oxidarea și denaturarea proteinelor, alterarea membranei citoplasmatice și acțiunea asupra metabolismului.

a)<u>Oxidarea şi denaturarea proteinelor.</u> Printr-un astfel de mecanism acţionează apa oxigenată şi derivaţii halogenaţi, care oxidează grupările SH ale enzimelor alterîndu-le ireversibil, sau sărurile metalelor grele (derivaţii minerali sau organici ai mercurului spre exemplu) care se cuplează cu aceleaşi grupări SH inactivîndu-le. Alcoolii denaturează proteinele într-o manieră comparabilă cu denaturarea termică.

b)<u>Alterarea membranei citoplasmatice</u>. Membrana citoplasmatică avînd un rol esenţial în permeaţia selectivă a metaboliţilor, alterarea structurii sale antrenează o dezorganizare a metabolismului celular, degenerarea celulei şi în final moartea ei. Prin acest mecanism acţionează agenţii liposolubili, compuşii fenolici, săpunurile, dar mai ales detergenţii.Aceştia din urmă prin grupările hidro şi liposolubile se fixează pe membrana lipoproteică a celulei bacteriene şi pe mediul apos înconjurător denaturînd astfel structura membranei care nu îşi mai poate îndeplini funcţia vitală de permeaţie.

c)<u>Acţiune asupra metabolismului</u>. Unele substanţe chimice, bacteriostatice sau bactericide, influenţează metabolismul celular, prin inhibarea activităţii enzimatice. Astfel cianurile şi florurile sînt inhitori puternici ai proceselor de respiraţie celulară. Coloranţii bazici (albastrul de metilen, violetul de genţiană) se combină cu ARN citoplasmatic inactivînd toate funcţiile metabolice. In această categorie intră, de asemenea, agenţii mutageni(acridinele şi derivaţii lor) şi agenţii chelatori (derivaţii de quinoleină).

Funcţie de structura chimică şi de modul de acţiune, agenţii chimici pot fi clasaţi în mai multe grupe:

1.<u>Substanţe oxidante</u>

a)Apa oxigenată. Peroxidul de hidrogen sau apa oxigenată ca şi toţi compuşii capabili să o formeze (perboraţii şi persulfaţii alcalini) sînt antiseptici eficienţi. In concentraţie de 3% ea este un dezinfectant al plăgilor dar eficacitatea îi este limitată de descompunerea ei rapidă în contact cu ţesuturile.

b)Clorul şi derivaţii săi. Clorul gazos sau diversele

sale combinaţii chimice sînt antisepticii cei mai comuni.Clorul este universal folosit pentru sterilizarea apei potabile,tratarea apelor poluate, dezinfectarea localurilor şi obiectelor contaminate. Sub formă gazoasă clorul este un toxic dificil de manipulat. Compuşii săi lichizi ca hipocloriţii şi cloraminele, sînt mai des utilizaţi. Hipocloritul de calciu sau clorura de var este un amestec de clorură şi de hidroxid.de calciu. Puterea sa dezinfectantă este funcţie de cantitatea de clor pe care o degajă. Hipocloritul de sodiu, cunoscut sub denumirea de apă de Javel, este de asemenea un bun dezinfectant.

In sterilizarea apei se utilizează şi dioxidul de clor, un dezinfectant activ şi capabil să suprime gustul dezagreabil dat de unele substanţe.

O altă categorie de compuşi cloruraţi o reprezintă cloraminele. Acestea sînt amine la care atomii de hidrogen de la gruparea aminică, sînt înlocuiţi prin atomi de clor. Ele au o acţiune mai prelungită dar mai slabă decît a hipocloriţilor.

Toţi compuşii clorului acţionează printr-un mecanism unic(fig.nr.57) formînd acidul hipocloros (ClOH) care se des-

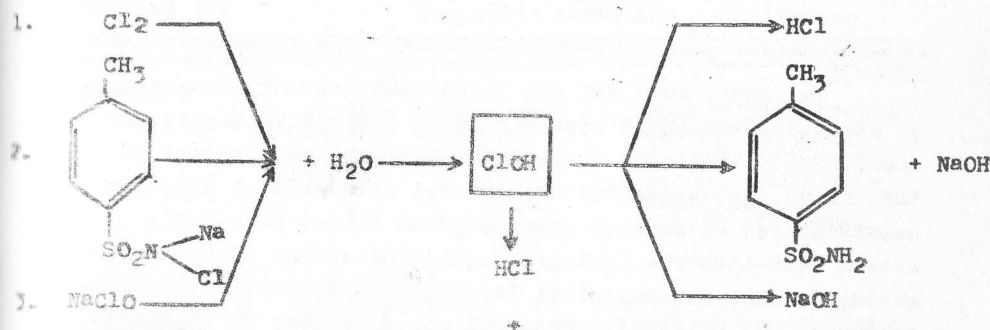


Fig.nr.57.Mecanismul de acţiune a compuşilor cloruraţi 1:clor;2:cloramină;3:hipoclorit de sodiu.

compune uşor în HCl + O. Oxigenul astfel eliberat are o puternică acţiune oxidantă omorînd microorganismele în formă vegetativă. Sporii sînt mai rezistenţi, reclamînd doze de 100 de ori mai mari.

In tabelul nr.21 sînt prezentate principalele forme de clor şi acţiunea lor antimicrobiană.

Tabel nr.21

Diferitele forme de clor în soluţii apoase

Forma de clor	Compoziţia	Formula	Activitatea
Clor activ	clor elementar acid hipocloros	Cl $HClO$	+++ (maximă
Clor liber	clor elementar	Cl_2	++
	acid hipocloros	$HClO$	după conţinutul în HClO
	hipocloriţi	ClO^-	
Clor combinat	monocloramine	NH_2Cl	
	dicloramine	$NHCl_2$	+(slabă)
	tricloramine	NCl_3	
Clor total	clor elementar	Cl_2	
	acid hipocloros	$HClO$	++
	hipocloriţi cloramine	ClO^-	după conţinutul în HClO

c)Iodul. Este cel mai vechi dezinfectant cunoscut, cu acţiune predominant bactericidă şi fungicidă-soluţia alcoolică iodo-iodurată, cunoscută sub numele de tinctură de iod, fiind dezinfectantul tradiţional al pielei şi plăgilor superficiale. In acelaşi scop se poate folosi şi soluţia apoasă iodo-indurată (soluţia Lugol). In ultima vreme se folosesc o serie de compuşi ai iodului cu detergenţii anionici, cationici sau neionici, cunoscuţi sub denumirea de iodofori. Ei sînt bactericizi şi fungicizi prezentînd avantajul că eliberează iodul lent dar progresiv. Utilizarea acestor compuţi ca antiseptici ai pielei, mucoaselor şi plăgilor cunoaşte o largă răspîndire.

2.Alcooli

Alcoolul etilic are acţiune bactericidă în concentraţie de 50-70%, numai asupra celulelor vegetative. Se foloseşte ca dezinfectant cutanat.

Alcoolul metilic este mai puţin activ dar este foarte toxic pentru om şi animalele superioare.

Alcooli superiori (propilic, butilic, amilic) au o acţiune bactericidă care creşte cu greutatea moleculară dar în acelaşi timp scade solubilitatea lor în apă ceea ce le limitează utilizarea.

3.Metalele grele şi sărurile lor

Unele metale au acţiune bactericidă chiar în doze foarte mici (acţiune oligodinamică), datorită slabei lor ionizări şi afinităţii ionilor metalici pentru proteinele celulare.

Sărurile metalelor grele sînt însă mult mai eficiente şi mai larg utilizate. Cele mai comune sînt sărurile de argint, mercur, cupru, zinc şi chiar cele de aur. Toate inactivează celulele precipitînd proteinele enzime sau combinîndu-se cu grupările -SH.(Tabel nr.22).

Tabel nr.22

Principalele metale grele şi sărurile lor utilizate ca agenţi antimicrobieni.

Metalul	Compuşii	Utilizare
1	2	3
MERCUR	1.Anorganici:	
	-clorura mercurică	-pomadă antiseptică
	-biodură de mercur	-antiluetic
	-cianură de mercur	-dezinfectarea instrumentelor chirugicale
	-oxidul de mercur	-pomadă oftalmică
	2.Organici: -aromatici:	
	-mercurocromul	-antiseptic al pielei şi mucoaselor
	-mercurobutol (Mercril)	-antiseptic extern şi vaginal
	- boratul de fenil mercur(Merfen)	- antiseptic al pielei şi mucoaselor

1	2	3
	-alifatici: -mertiolatul de sodiu(Meserptil)	-antiseptic al pielei şi mucoaselor;dezinfectant al instrumentelor chirurgicale; conservant biologic.
ARGINT	Nitrat de argint	-în soluţie 1% se foloseşte contra oftalmiei gonococice la noii născuţi
	Preparate coloidale minerale sau organice	-utilizare în oto-rino-laringologie şi oftalmologie; colire,instilaţii nazale,injecţii uretrale.
CUPRU	Sulfatul de cupru	-colir,pomezi;puternic antifungic
ZINC	Sulfatul de zinc	-colir.
AUR	Clorura de aur Cianura de aur	-interes istoric; altădată folosite ca agenţi antituberculoşi.

4.<u>Fenolii</u>

Compuşii fenolici posedă, datorită funcţiei feno,remarcabile proprietăţi bacteriostatice, bactericide şi fungicide. Totuşi, din cauza acţiunii nocive asupra organismelor superioare, în prezent utilizarea lor este limitată. Obişnuit mai sînt utilizaţi ca dezinfectanţi generali, ca antiseptici pulmonari sau intestinali. Unii derivaţi fenolici(hexilrezorcina) se foloseşte, pe cale internă, ca antiseptic urinar. Acţiunea antimicrobiană a fenolilor este potenţată de sărurile de sodiu şi potasiu, dar este considerabil atenuate de substanţele organice.

5.<u>Săpunurile şi detergenţii sintetici</u>

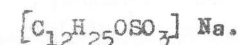
Săpunurile sînt sărurile de sodiu sau potasiu ale acizilor graşi cu greutate moleculară mare(oleic ,linoleic,ricinoleic).Puterea lor antiseptică variază funcţie de specia

microbiană, dar acţiunea lor este în principal de tip mecanic. Ele reduc tensiunea superficială şi cresc capacitatea de înmuiere a apei, microorganismele fiind antrenate în spumă ca într-o reţea şi apoi îndepărtate prin clătire.

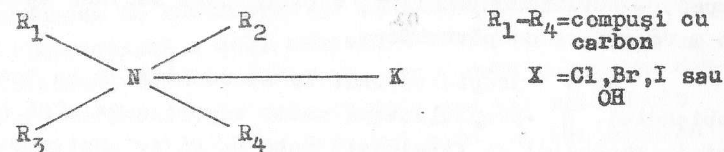
Ricinoleiatul de sodiu are o acţiune antiseptică proprie fiind utilizat în igiena bucofaringiană.

Detergenţii sînt agenţi tensioactivi de sinteză.Ei pot fi grupaţi în trei categorii:

a)<u>Detergenţi anionici</u> la care gruparea anionică este activă, exemplu laurilsulfonatul de sodiu:


$[C_{12}H_{25}OSO_3]$ Na.

b)<u>Detergenţi cationici</u>, la care activ este cationul. Cei mai importanţi dintre aceştia, cu efect antimicrobian, sînt sărurile cuaternare de amoniu, cu formula generală:



Ei sînt puternici bacteriostatici în concentraţie de 10^{-4} - 10^{-5} şi au avantajul că sînt solubili, incolori şi nu au miros dezagreabil. Aceşti detergenţi au însă mare toxicitate şi nu pot fi folosiţi decît ca dezinfectanţi ai pielei, ai plăgilor superficiale, ca antiseptici dentari sau în oftalmologie.

c)<u>Detergenţi neionici</u> - fără acţiune antimicrobiană.

Detergenţii sintetici avînd o largă utilizare industrială şi gospodărească şi fiind nebiodegradabili, constituie importanţi factori de poluare chimică. Acumularea lor în apele reziduale industriale şi menajere împiedică epurarea acestora iar deversarea în cursurile naturale de apă compromite echilibrul biologic. Din aceste motive, legile de protecţie a mediului înconjurător interzic utilizarea lor industrială şi casnică. Locul detergenţilor sintetici a fost luat de detergenţi noi,biodegradabili şi detergenţii enzimatici.

6.Coloranţii.

Unii coloranţi au acţiune bacteriostatică fiind utilizaţi ca antiseptici locali. Aşa sînt albastrul de metilen, verdele brillant, violetul de metil, violetul de genţiană, acridinele, verdele malachit, etc.

7.Agenţii gazoşi

O serie de substanţe gazoase au o puternică acţiune antimicrobiană. Cele mai importante sînt:

a)Aldehida formatică, sub formă de vapori. Este puternic bactericidă pentru formele vegetative şi se utilizează pentru dezinfectarea spaţiilor şi a obiectelor care nu pot fi sterilizate prin căldură.

b)Etilendioxidul. Oxidul de etilen gazos la temperatura obişnuită, în stare pură, deşi are o puternică acţiune antimicrobiană, nu poate fi utilizat deoarece este inflamabil. El devine utilizabil numai în amestec cu CO_2 sau freon. Are un spectru antimicrobian larg, o pronunţată acţiune sporocidă şi o mare putere de pătrundere.

c) β -propiolactona. In stare lichidă la temperatura obişnuită, β -propiolactona emite vapori care sînt bactericizi, sporocizi şi fungicizi. Este de 25 ori mai activă decît formolul şi de 4000 de ori decît etilendioxidul. Nu este inflamabilă şi nici explozivă. Este penetrantă dar se elimină uşor. Se utilizează la sterilizarea obiectelor,materialelor chirurgicale, spaţiilor sau chiar la sterilizarea unor medii de cultură. In ultima vreme, din cauza proprietăţilor sale cancerigene, β -propiolactona- este interzisă în unele ţări.

d)Esenţe volatile. Esenţele volatile naturale au o oarecare acţiune bacteriostatică datorită compuşilor fenolici, terpenici, alcoolici şi aldehidici pe care îi conţin. Cele mai utilizate sînt esenţa de eucalipt ca antiseptic al căilor respiratorii, esenţa de cuişoare ca dezinfectant în chirurgia dentară, esenţa de santal dezinfectant al căilor urinare,ş.a. Ele pot fi înlocuite prin produşii lor activi: eucaliptol, eugenol, etc. Aceste uleiuri volatile pot fi utilizate şi ca conservanţi alimentari.

Substanţe antimicrobiene utilizate ca conservanţi alimentari.

Cele mai frecvent utilizate în acest scop sînt: anhidrida sulfuroasă şi bisulfitul de sodiu în conservarea vinului şi a sucurilor de fructe, acizii benzoic şi sărurile lor, acidul sorbic sau esterii lor, compuşii fenolici(fenol,ortocrezol, timol,gaiacol, eugenol)chinone şi alţi compuşi.

Alegerea conservantului chimic trebuie făcută funcţie de acţiunea sa antimicrobiană dar nu trebuie să diminuieze valoarea nutritivă a alimentului.

3.7.2.1.Metode de determinare a activităţii agenţilor antimicrobieni

Determinarea activităţii unei substanţe antimicrobiene se poate face prin comparaţie cu activitatea unei substanţe cunoscute, de referinţă. Pe acest principiu se bazează metoda coeficientului fenolic a lui Rideal şi Walker (1903).Această metodă foloseşte ca antiseptic de referinţă fenolul iar valoarea antimicrobiană a noii substanţe testate se exprimă prin coeficientul fenolic (CF) care arată dacă substanţa respectiva este un antiseptic mai puternic sau mai slab decît fenolul, după cum valoarea sa este mai mare sau mai mică de 1. Testarea se face cu două bacterii test: Salmonella typhi şi Staphylococcus aureus, tulpina Oxford.Se determină pentru una din speciile test, în condiţii riguros standardizate, diluţia maximă de fenol şi de substanţă de testat, care omoară bacteriile în 10 minute dar nu le omoară în 5 minute. Prin împărţirea diluţiei active din substanţa cercetată la diluţia activă de fenol se obţine coeficientul fenolic. Exemplu: Staphylococcus aureus (Oxford) este distrus,în condiţiile amintite, de fenol în diluţia de 1/55, iar de mertiolatul de sodiu în diluţia de 1/1760:

$$CF = \frac{1760}{55} = 32,$$ respectiv mertiolatul de sodiu are o putere antiseptică de 32 ori mai mare decît a fenolului.

Metoda coeficientului fenolic nu are o valoare absolută deoarece acţiunea fenolului asupra microorganismelor nu

este obligatoriu comparabilă cu cea a substanţei de testat iar sensibilitatea bacteriei test nu în mod necesar este aceeaşi faţă de ambele substanţe. Reprezintă totuşi o metoda orientativă.

Acţiunea antimicrobiană a agenţilor chimici este condiţionată de cinci factori:

-concentraţia agentului;
-timpul de contact dintre agent şi celula microbiană;
-compoziţia mediului şi
-concentraţia celulelor microbiene.

In general, un agent chimic va avea o acţiune antimicrobiana cu atît mai intensă, cu cît concentraţia lui este mai mare, timpul de contact mai îndelungat, temperatura mai ridicată, concentraţia mediului în substanţe organice mai mică şi cu cît concentraţia celulelor microbiene supuse acţiunii chimice este mai mica.

3.7.3. <u>Substanţele chimioterapice</u>

Substanţele chimioterapice sînt substanţe antimicrobiene care se utilizează în tratamentul bolilor infecţioase. Principiile de bază ale chimioterapiei au fost stabilite încă din 1909 de Paul Ehrlich. După <u>Ehrlich</u>, pentru ca o substanţă să poată fi utilizată, pe cale generală, în terapie unor maladii infecţioase ea trebuie să aibă o toxicitate selectivă, respectiv să fie toxică pentru microorganism şi netoxică pentru gazda sa.

Primele substanţe chimioterapice au fost arsenfenaminele descoperite de <u>Ehrlich</u>. Acestea sînt derivaţi ai arseniului activi în tratamentul sifilisului (<u>Salvarsan</u>). Au urmat sulfamidele descoperite de <u>Domagk</u> în 1935 şi apoi antibioticele introduse în terapeutică în 1941-1942, deşi era antibioticelor a fost inaugurată de <u>Alexander Flemming</u> încă din 1929 prin descoperirea penicilinei.

Astăzi se poate vorbi de existenţa a două mari categorii de substanţe chimioterapice: substanţe chimioterapice de sinteză şi antibioticele.

3.7.3.1.<u>Substanţele chimioterapice de sinteză</u>.

In această categorie intră:sulfamidele, acidul nalidixic,nitrofuranii, hidrochinoleinele, substanţele cu acţiune antituberculoase (acidul paraaminosalicilic, hidrazida acidului izonicotinic şi etambutolul.

a.<u>Sulfamidele</u>. In 1935 <u>Domagk</u> demonstra că un colorant <u>diazoic para-sulfamido-crizoidina (prontozilul)</u> era capabil să vindece infecţiile streptococice experimentale la şoareci. Ulterior cercetătorii francezi de la Institul Pasteur (<u>Fourneau</u> şi <u>Trefouel</u>) au arătat că din molecula prontozilului numai nucleul para-amino-sulfanil-amidic este activ, pentru ca apoi în mai puţin de 10 ani să fie sintetizate circa 5000 de noi derivaţi ai sulfanilamidei prin substituirea unui hidrogen de la gruparea sulfamidică (SO_2-NH_2) printr-un alt radical, după schema din fig.nr.58.

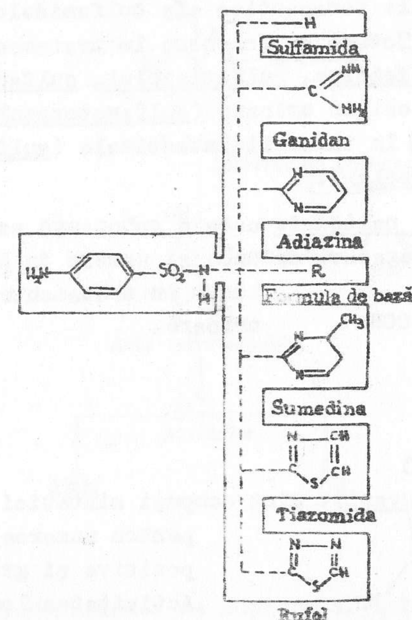
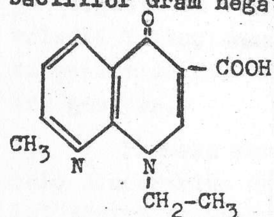


Fig.nr.58.Structura chimică a diferitelor sulfamide.

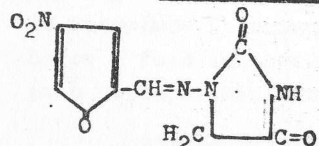
Sulfamidele sînt agenţi bacteriostatici acţionînd asupra bacteriilor pe cale de multiplicare, printr-un mecanism de inhibiţie competitivă, deoarece au o structură chimică analoagă acidului paraamino-benzoic (PAB). PAB intră în molecula acidului folic, factor vitaminic ce intervine în sinteza bazelor purinice şi pirimidinice. In prezenţa sulfamidelor care datorită analogiei structurale sînt încorporate în locul PAB, bacteriile nu mai formează acid folic şi încetează să-şi mai sintetizeze bazele azotate sau acizi aminici ca metionina şi serina. Prin inhibarea sintezei de acid folic sulfamidele opresc multiplicarea bacteriilor fără a le omorî(acţiune bacteriostatică). In prezenţa unui exces de PAB efectul lor bacteriostatic se anulează. Mecanismul de acţiune al sulfamidelor este schematizat în fig.nr.59.

Spectrul antimicrobian al sulfamidelor este foarte larg: cocigram negativi şi Gram pozitivi, bacili Gram negativi şi Gram pozitivi, clostridii şi chiar unele protozoare. Astăzi indicaţiile terapeutice ale sulfamidelor sînt limitate de antibiotice. Totuşi se folosesc în tratamentul unor infecţii generale (sulfapiridina, sulfatiazolul, sulfadiazina), în unele infecţii ale căilor urinare (sulfametoxazolul, sulfametiltiodiazolul) sau în infecţii intestinale (sulfaguanidina, succinilsulfatiazolul).

b. Acidul nalidixic este o substanţă activă împotriva bacililor Gram negativi de unde şi numele de Negram. Este utilizat în tratamentul infecţiilor urinare.



c. Nitrofuranii. Sînt compuşi sintetici bacterioizi pentru numeroase specii Gram pozitive şi gram negative. Activitatea lor diminuiază prin combinarea cu proteinele sanguine sau din umori. Se



Nitrofurantoina.

utilizează în tratamentul infecţiilor urinare.

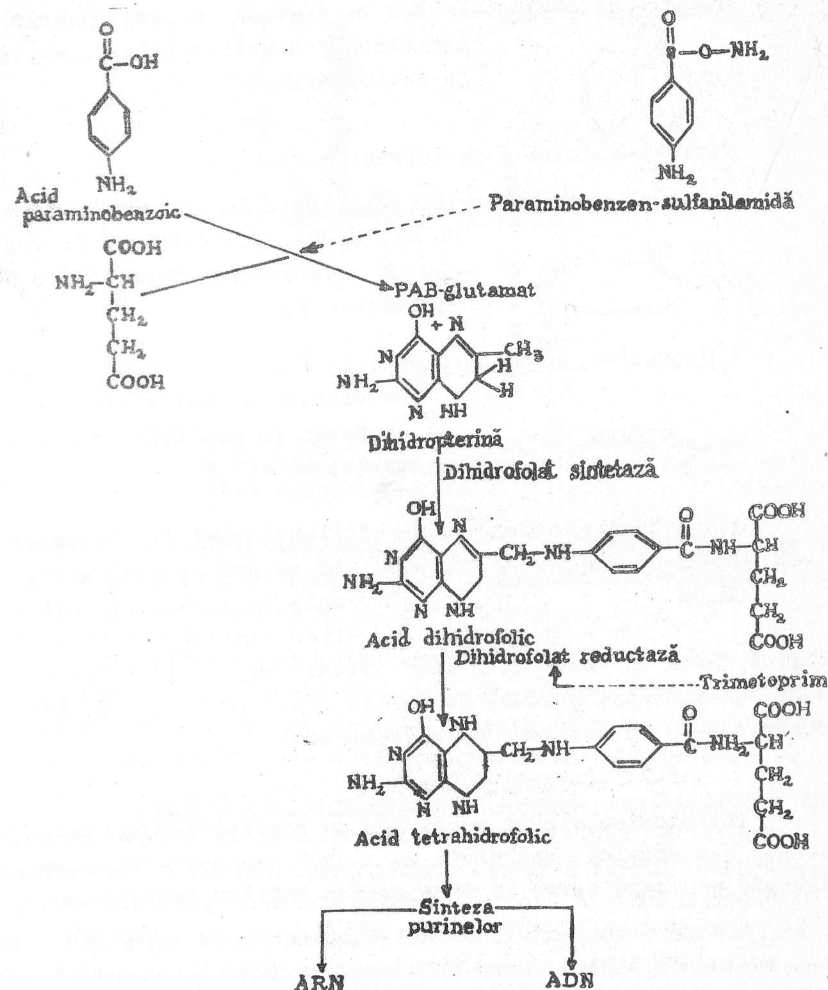
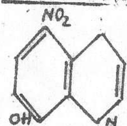


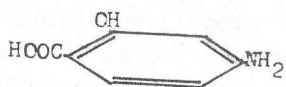
Fig.nr.59. Mecanismul de acţiune al sulfamidelor.

d.<u>Hidrochinoleina</u>. Produs de sinteză cu larg spectru antimicrobian utilizat în infecţiile căilor urinare.

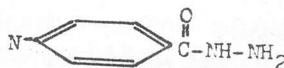


Nitro-5-hidroxi-8-chinoleina(Nebiol).

e.<u>Acidul para-aminosalicilic(PAS)</u>. Sub formă de săruri de Ca sau Na este utilizat în tratamentul tuberculozei împreună cu streptomicina.



f.<u>Hidrazida acidului izonicotinic(HIN)</u>. Tuberculostatic de sinteză se utilizează de asemenea în asociere cu streptomicina.



g.<u>Etambutolul</u>. Derivat de eltilendiamină ce acţionează asupra celulelor pe cale de diviziune inhibînd sinteza acizilor

$$CH_3-CH_2-\underset{CH_2OH}{CH}-NH-CH_2-CH_2-NH-\underset{CH_2OH}{CH}-CH_2-CH_3$$

nucleici. Este un tuberculostatic folosit mai ales în tratamentul tuberculozei produsă de bacili rezistenţi la HIN, administrîndu-se în asociere cu rifampicina.

3.7.3.2. <u>Antibioticele</u>

Antibioticele sînt substanţe cu acţiune bacteriostatică sau bactericidă, secretate de micro- sau macroorganisme, utilizate pe scară largă în terapeutica bolilor infecţioase.

Dintre cele peste 2500 antibiotice descrise pînă astăzi, peste 70% sînt produse de microorganisme iar dintre acestea circa 60% de actinomicete.(Fig.nr.60).

Era antibioticelor, anunţată încă din 1929 prin descoperirea penicilinei de către Alexander Fleming, avea să înceapă zece ani mai tîrziu cînd Florey şi Chain extrag şi purifică antibioticul care imediat, în timpul celui de al doilea război mondial, a fost introdus în terapeutică. A urmat apoi descoperirea principalelor antibiotice care au revoluţionat terapeutica. Majoritatea bolilor infecţioase au putut fi tratate şi

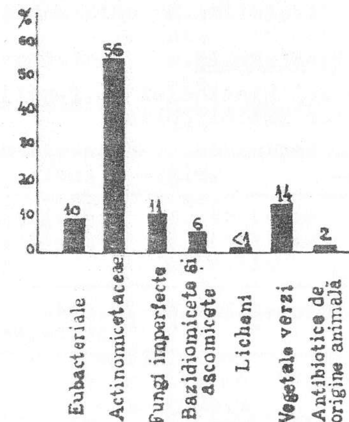


Fig.nr.60.Antibiotice(% din totalul antibioticelor cunoscute)produse de diferite organisme vii.

vindecat cu antibiotice. Aceasta a reprezentat perioada de aur a antibioticelor, prelungită după 1965 prin descoperirea şi utilizarea antibioticelor de semisinteză.

Au existat mai multe încercări de clasificare a antibioticelor după criterii diferite. In prezent cea mai răspîndită este clasificarea pe familii funcţie de structura chimică. O astfel de clasificare este prezentată în tabelul nr. 23.

A.<u>Familia antibioticelor lactamice</u>. Antibioticele din această familie se caracterizează prin nucleul β-lactam. Asociat cu un nucleu tiazolidinic formează acidul 6-amino-penicilanic care reprezintă structura de bază a penicilinelor. Dacă nucleul β-lactam este asociat cu un alt nucleu dihidro-tiazinic dă naştere acidului 7-amino-cefaloporanic,structura de bază a cefalosporinelor.

1.<u>Penicilinele</u>, sînt antibiotice produse de specii ale genului <u>Penicillium</u> şi <u>Aspergillus</u>. <u>Flemming</u> a decoperit penicilina produsă de <u>Penicillium notatum</u>, purificată apoi de <u>Florey</u> şi <u>Chain</u> în 1939. In prezent, industrial, penicilina este produsă de <u>Penicillium chrysogenum</u>, descoperit în 1946 de cercetătorii de la <u>NRRL</u>(Northen Regional Research Labora-

Tabel nr.23

Clasificarea antibioticelor în familii,originea și spectrul lor antimicrobian.

Familia	Antibioticul	Originea	Anul descoperirii	Spectrul antimicrobian Coci Gram +	Coci Gram −	Bacili Gram +	Bacili Gram −
β-lactamice Penicilina G	Penicilina G Penicilina V	Penicillium notatum și P.chrysogenum	1929	+	+	+	−
M	Meticină Oxacilină	Sinteză		+	+	+	−
A	Ampicilină Carbenicilină	Sinteză		+	+	+	+
Cefalosporime	Cefalosporina C	Cephalosporium acremonium	1945	+	+	+	+
	Cefalotina Cefaloridina						
Oligozaharide	Streptomicina	Streptomyces griseus.	1944				
	Neomicina	S.fradiae	1949				
	Framicetina	S.lavendulae	1947				
	Paromomicina	S.rhimosus	1959	+	+	+	+
	Kanamicina	S.kanamyceticus	1958				
	Gentamicina	Micromonospora monospores					
	Tobramicina	S.tenebrarius	1967				
Tetracicline	Tetraciclina	S.texasi	1953				
	Clortetraciclina	S.aureofaciens	1946	+	+	+	+
	Demetilclortetraciclina	" "					
	Oxitetraciclina	S.rimōsus	1950				
Cloramfenicol	Cloramfenicol Tiamfenicol	S.venezuelea Sinteză	1947	+	+	+	+

Tabel nr.23-urmare

Macrolide	Eritromicina	S.erythreus	1952				
	Oleondomicina	S.antibioticus	1954				
	Spiramicina	S.ambofaciens	1954	+	+	+	+
	Kitasamicina	S.kitasaensis	1953				
	Lincomicina	S.lincolnensis.					
Sinergistine	Virgimicina Pristinamicina	S.virginiae S.pristinaespiralis	1962	+	+	+	+
Rifamicine	Rifamicina SV	S.mediteraneus	1948	+	+	+	−
	Rifampicina "	" "		+	+	+	+
Polipeptide bazice.	Polimixina	Bacillus polymyxa.	1947	−	−	−	+
	Bacitracina	B.lichniformis	1945	+	+	+	−
	Thyotricina	B.brevis	1939	+	+	+	−
Alte antibiotice	Fucidamina	Fusidium coccineum		+	−	−	−
	Novobiocina	S.spheroides	1955	+	−	−	−
	Vancomicina	S.orientalis		+	−	−	−
	Ristocetina	Nocardina lurida					

Notă: In această clasificare nu sint cuprinse antibiotice polienice (antifungice).

tory) Peoria, S.U.A. Penicilinele naturale produse de Penicillium chrysogenum sint numeroase: penicilina G(benzil-penicilina) penicilina V (fenoximetil-penicilina),penicilinele F, K, O ș.a.

Izolarea acidului 6-amino-penicilamic, nucleul moleculei de penicilină, a permis obținerea penicilinelor de semisinteză.

Penicilinele se clasifică,funcție de proprietățile lor, în patru grupe (Fig.nr.61).

a)Grupul penicilinelor G,Peniciline naturale dintre care cele mai importante sint:

-Penicilina G(benzil-penicilina)solubilă în apă, dar instabilă. Este sensibilă la penicilinază și e inactivată de

aciditatea sucului gastric, din care cauză nu poate fi administrată per os. Se utilizează sub formă de sare de Na sau K, injectabilă parenteral.

-Penicilina V (fenoximetil-penicilina), solubilă în apă dar stabilă în mediu acid şi parţial rezistentă la penicilinază. Se administrează per os(orocilină).

Alte peniciline: fenil-etil-penicilina(feneticilina), fenoxi-propil-penicilina(propicilina), fenoxi-benzil-penicilina(fenbecilina) ş.a., au o acţiune similară.

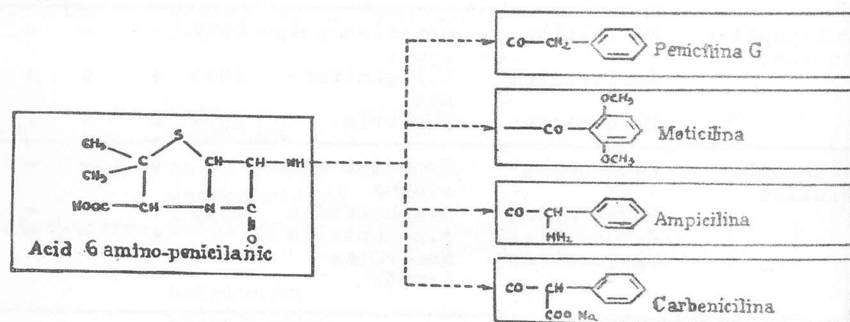


Fig.nr.61. Familia penicilinelor.

b)Grupul penicilinelor M - metilcilinele. Sînt penicilinele semisintetice rezistente la penicilinază.
Cele mai importante sînt: meticilina, oxacilina, cloxacilina, nafcilina, dicloxacilina. Mai puţin active decît celelalte peniciline, ele se folosesc cu succes în tratamentul infecţiilor produse de stafilococii penicilino rezistenţi datorită penicilinazei. Cu excepţia meticilinei, toate penicilinele din acest grup sînt stabile în mediu acid şi pot fi administrate pe cale bucală.

c)Grupul penicilinelor A- ampiciline Peniciline de semisinteză, sensibile la penicilinază dar cu un spectru antimicrobian larg, sînt administrate pe cale bucală. Spre deosebire de celelalte peniciline sînt active împotriva bacililor gram negativi. Cele mai importante sînt: ampicilina,metaampicilina, pivampicilina, hetacilina.

d)Carbenicilina. Este o penicilină cu spectru larg dar în special activă faţă de Pseudomonas aeruginoasa şi Proteus rezistent la ampicilină. Este mai rezistentă la penicilinază decît ampicipilina.

Spectrul antibacterian al penicilinelor este larg:coci Gram pozitivi şi Gram negativi, bacili Gram pozitivi, treponeme. Unele peniciline (ampicilina) sînt active faţă de bacilii Gram negativi: Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Proteus mirabilis, Brucella, Pasteurella.

In prezenţa penicilinei G unele bacterii devin penicilino rezistente producînd o enzimă indusă, penicilinaza. Producerea de penicilinază este guvernată genetic de o genă localizată în cromozomul bacterian sau mai frecvent într-o plasmidă.

Penicilinele pot fi, aşa cum am văzut, administrate parenteral sau per os. Ele difuzează rapid în toate organele, ţesuturile şi în deosebi în lichidul cefalorahidian. Sînt excretate rapid prin urină. Pentru a întîrzia eliminarea lor din organism se pot utiliza suspensii apoase sau uleioase de procain-penicilină(penicilină-retard).

Toxicitatea penicilinelor este neglijabilă. Se pot administra doze de 100 milioane U.I.[x]) pe zi, sau 60 g penicilină G (1 mg= 1670 U.I.) fără a se produce tulburări grave. Toxicitatea penicilinelor depinde însă de gradul lor de puritate.

Penicilinele sînt totuşi antigenice. Ele pot sensibiliza organismul şi pot, la o nouă inoculare,declanşa şocul anafilactic, uneori mortal.

2.Cefalosporinele. Sînt antibiotice asemănătoare penicilinelor, produse de specii ale genului Cephalosporium. Astfel cefalosporina C este produsă de Ceohalosporium acremonium. Studiul structurii chimice a moleculei de cefalosporină C a arătat că nucleul ei de bază este prezentat de acidul 7-aminocefalosporanic. Aceasta a permis obţinerea cefalosporinelor de semisinteză, din care două:cefalotina şi cefaloridina sînt deosebit de active.(Fig.nr.62).

x)U.I.=unitate internaţională.O unitate internaţională sau unitate Oxford(U.O.)este cantitatea minimă de penicilină, care adăugată unui tub cu 50 ml bulion,opreşte dezvoltarea speciei Staphylococcus aureus tulpina Oxford.

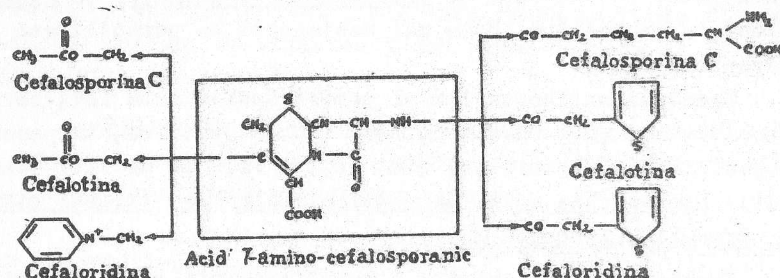


Fig.nr.62.Familia cefalosporinelor

Spectrul antibacterian al cefalosporinelor este comparabil cu cel al ampicilinei dar activitatea lor asupra bacililor gram negativi este mai slabă. Sînt însa rezistente la penicilinază. Toxicitatea lor este mai mică decît a penicilinelor. Se administrează parenteral. Difuzează rapid în ţesuturi dar nu pot străbate cu uşurinţă meningele.

B.Familia antibioticelor oligozaharidice sau aminozidice.

Din această familie fac parte: streptomicina, neomicina, framicetina, paromomicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina. Toate au o structură asemănătoare pe bază de oze aminate.

a)Streptomicina şi dihidrostreptomicina. Streptomicina descoperită de Waksman în 1944 este produsă de Streptomyces griseus. Din punct de vedere chimic conţine un nucleu-streptidina, o oză-streptoză şi o ozamină -N- metilglucozamina. (Fig.nr.63).Se utilizează sub formă de sulfat sau pantotenat. Dacă funcţia aldehidică a streptozei este redusă într-o funcţie alcoolică primară se obţine dihidrostreptomicina care se foloseşte, de asemenea, sub formă de metionat sau pantotenat. Streptomicina este solubilă în apă şi are o mare stabilitate. Se poate conserva în soluţii apoase mai mult de o lună,la $15^{o}C$, iar în stare uscată mai mulţi ani. Activitatea sa creşte în mediu alcal. La pH=8 are o activitate de 100-1000 mai mare decît la pH=6. Spectrul antibacterian este larg cuprinzînd bacterii Gram pozitive şi Gram negative dar importanţa terapeutică constă în activitatea ei împotriva bacilului tu-

berculozei. Folosirea streptomicinei este însă limitată de doi factori:

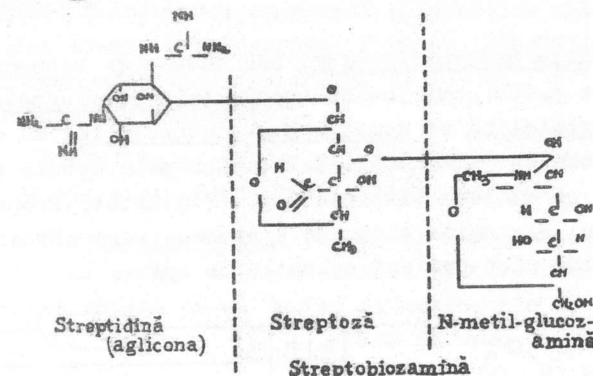


Fig.nr.63.Streptomicina

-apariţia mutanţilor bacterieni rezistenţi ceea ce impune folosirea streptomicinei în asociaţie cu penicilina sau tetraciclina,în infecţiile bacteriene sau în asociaţie cu PAS şi HIN în tratamentul tuberculozei.

-toxicitatea ridicată pentru nervul acustico-vestibular. Streptomicina produce adesea vertigii şi ataxie(necoordonarea mişcărilor)iar dihidrostreptomicina poate provoca surditate definitivă.

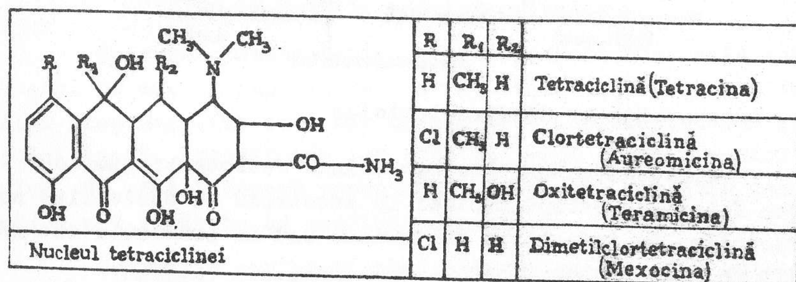
b)Kanamicina, gentamicina, tobramicina. Sînt antibiotice cu spectru antibacterian larg, active împotriva bacteriilor Gram pozitive şi negative, foarte solubile şi stabile în soluţii apoase. Activitatea lor este de tip bactericid pentru enterobacterii, Brucella şi Haemophilus. Sînt, asemenea, active faţă de cocii Gram negativi şi Gram pozitivi dar rezistenţi la acţiunea lor sînt streptococii, Serratia, Pseudomonas, Provodencia şi bacteriile anaerobe.

Tobramicina este antibioticul cel mai activ din acest grup chiar şi pentru Pseudomonas.

In infecţii generale se administrează pe cale parenterală, iar în cele intestinale pe cale orală. Nu au însă o bună difuziune în ţesuturi şi se elimină pe cale urinară în

concentrații active. Au o oarecare toxicitate acustico-vestibulară, mai pronunțată la kanamicină care în același timp este și nefrotoxică.

C.<u>Familia tetraciclinelor</u>. Sub numele de tetracicline s nt cunoscute patru antibiotice (<u>tetraciclină</u>, <u>clortetraciclină</u>, <u>oxitetraciclină</u> și <u>demetil-clor-tetraciclină</u>)cu o structură de bază comună, diferențiindu-se doar prin natura radicalilor grefați pe nucleul tetraciclinic.(Fig.nr.64).Proprietățile chimice și biologice sînt, de asemenea, asemănătoare. In stare cristalină sînt perfect solubile în apă.



R	R1	R2	
H	CH_3	H	Tetraciclină (Tetracina)
Cl	CH_3	H	Clortetraciclină (Aureomicina)
H	CH_3	OH	Oxitetraciclină (Teramicina)
Cl	H	H	Dimetilclortetraciclină (Mexocina)

Fig.nr.64.Familia tetraciclinelor

Tetraciclina, clortetraciclina (aureomicina) și demetil-clortetraciclina sînt produse de Streptomyces aureofaciens, iar oxitetraciclina(teramicina) este produsă de Streptomyces rimosus.

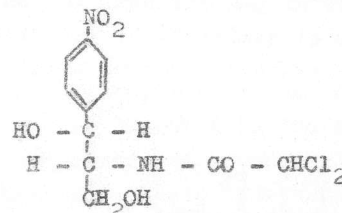
Toate tetraciclinele au un spectru antimicrobian foarte larg(bacterii Gram pozitive, Gram negative, rickettsii și unele clamidii care produc psitacoza, ornitoza și linfogranulomatoza ingvinală veneriană). Ele au avantajul de a fi active prin administrare orală absorbindu-se ușor la nivelul intestinului. Se elimină prin urină și fecale, de unde necesitatea administrării repetate, din patru în patru ore. Cea mai activă și cu persistență cea mai mare în sînge este demetil-clor-tetraciclina (mexamicina).

Administrarea tetraciclinelor poate determina apariția bacteriilor rezistente la toate cele patru tipuri(rezistența încrucișată). De asemenea prezintă dezavantajul că dezechilibrează considerabil microflora normală intestinală

favorizînd dezvoltarea exagerată a speciilor mai mult sau mai puțin rezistente (<u>Pseudomonas</u>, <u>Proteus</u>, <u>Staphylococcus</u>, <u>Candida</u>) care produc eneterocolite destul de severe, iar uneori mortale (stafilococi eneterotoxici).

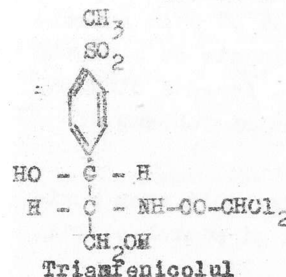
D.<u>Familia cloramfenicolilor</u>, este reprezentată de două antibiotice: cloramfenicolul și tiamfenicolul.

a)<u>Cloramfenicolul</u>, produs de Streptomyces venezuelae, este obținut astăzi pe cale sintetică. Structura sa chimică este reprezentată de un nucleu nitrobenzenic cu doi atomi de clor de unde și numele său.Este puțin solubil în apă și foarte solubil în solvenți organici. Are o remarcabilă stabilitate la căldură și la o gamă destul de largă de pH(pH 3 - 9).Se administrează per os fiind ușor absorbit la nivelul intestinului. Difuzează rapid în țesuturi inclusiv lichidul cefalorahidian. Este unul din puținele antibiotice care se poate absorbi prin mucoasa rectală. Este activ împotriva a numeroase bacterii Gram negative și Gram pozitive, ricketsii, treponeme. Este în special utilizat în tratamentul febrei tifoide.



In ultimii ani utilizarea cloramfenicolului a fost restrînsă din cauza unor accidente grave de ordin hematologic (leucopenie,agranulocitoză, aplazie medulară). Rămîne totuși antibioticul specific pentru salmoneloze și în cazul unor infecții grave în care antibiograma îl recomandă ca cel mai eficient.

b) <u>Tiamfenicolul</u> se deosebește puțin de cloramfenicol. In nucleul benzenic gruparea NO_2 este înlocuită cu un radical SO_2-CH_3,de unde și numele.Prezintă proprietățile generale și spectrul antibacterian mult asemănătoare cloramfenicolului.



Triamfenicolul

E.Familia macrolidelor.

Această familie cuprinde un număr de antibiotice produse de specii ale genului Streptomyces, care au o structură comună, caracterizată printr-un ciclu lactonic. Membrii familiei se deosebesc prin natura zahărului neazotat legat de ciclul lactonic.

Principalul antibiotic macrolidic este eritromicina, produsă de Streptomyces eritreus.Este activă sub formă de propionat de eritromicină, uşor absorbiţi pe cale digestivă. Se elimină prin urină şi fecale. Are un spectru bacteriostatic comparabil, în oarecare măsură, cu cel al penicilinei. Inhibă bacteriile Gram pozitive printre care şi stafilococii penicilinorezistenţi. In general este bine tolerată. Structura chimică e dată în fig.nr.65.

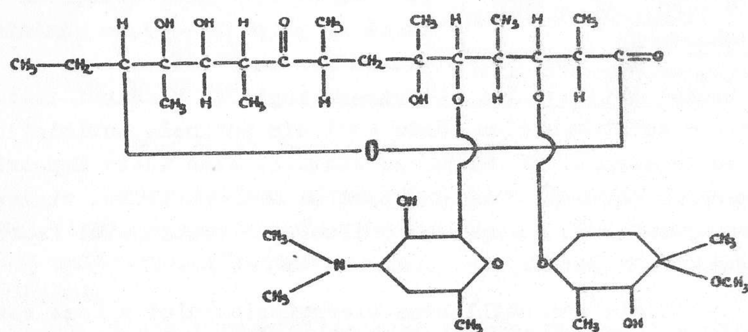


Fig.nr.65.Eritromicina

F.Familia rifamicinelor. Cuprinde două antibiotice: rifamicina SV şi rifampicina, ambele produse de Streptomyces mediteranei.

Rifamicina SV este o naftochinohă cu un lanţ lung alifatic, iar rimfampicina derivă din rifamicină SV prin substituirea unui atom de H de la nucleul naftochinonic cu o scurtă catenă cu un nucleu piperazinic.(Fig.nr.66). Această diferenţă de structură antrenează şi activităţi antimicrobiene diferite.

a)Rifamicina SV, este activă faţă de cocii gram pozitivi şi gram negativi, bacili gram pozitivi şi microbacterii.

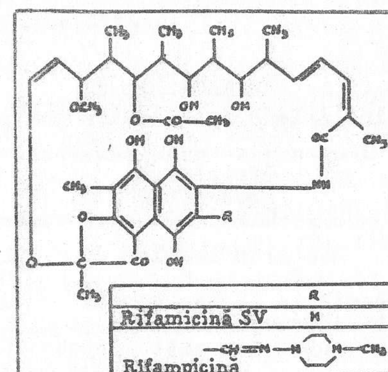


Fig.nr.66.Familia rifamicinelor

Avînd o puternică acţiune bactericidă faţă de stafilococi este cu succes folosită în tratamentul infecţiilor produse de aceştia. Se administrează parenteral şi se elimină prin bilă.Este bine tolerată de toate ţesuturile,dar prezintă o anumită toxicitate pentru parenchimul hepatic.

b)Rifampicina, este un antibiotic antituberculos puternic. Puterea sa bactericidă este rapidă şi totodată în concentraţii foarte slabe. Este cel mai activ agent antituberculos cunoscut pînă astăzi şi numai rare ori permite apariţia mutanţilor rezistenţi. Se administrează per os. Se elimină prin bilă după care se reabsoarbe în intestin. Obişnuit este bine tolerată de organism.

G.Familia antibioticelor polipeptidice. Cuprinde antibiotice produse de bacterii şi streptomicete, a căror moleculă este constituită din diferiţi acizi aminici reuniţi prin legături peptidice. Cele mai importante antibiotice din acest grup sînt prezentate în tabelul nr.24.

H.Familia antibioticelor polienice(antifungice).

Această familie reuneşte antibiotice cu acţiune antifungică, utilizabile pe cale bucală sau prin aplicaţii locale, dar fără să existe între ele o analogie structurală strictă. Caracteristic pentru molecula lor este prezenţa unui anumit număr de duble legături. Cele mai importante sînt prezentate în

tabelul nr.25.

Tabelul nr.24

Principalele antibiotice polipeptidice

Antibioticul	Organismul producător	Spectrul antimicrobian
Tirotricina	Bacillus brevis	Larg-gram pozitiv
Gramicidina S	" "	Gram pozitivi
Bacitracina	Bacillus licheniformis	Gram pozitivi
Cicloserina	Streptomyces orhidaceus	Larg.Antituberculos
Actinomicina	Streptomyces antibioticus	Gram pozitiv.Antitumoral
Polimixinele A,B,C,D,E.	Bacillus polymyxa	Gram negativ.Pseudomonas
Colistinele	Aerobacillus colistinus	Gram negativi
Nisina	Streptococcus lactis	Gram pozitivi
Subtilina	Bacillus subtilis	Gram pozitivi şi negativi
Viomicina	Streptoyces floridae	Antituberculoase
Florimicina	Streptomyces punicus	

Tabel nr.25

Principalele antibiotice antifungice.

Antibioticul	Organismul producător	Domeniu de utilizare
Actidiona(cicloheximida)	Streptomyces griseus Streptomyces noursei	Agricultură
Amfotericina B	Streptomyces M.1575	Medicină
Fumigalina	Aspergillus fumigatus	Medicină
Griseofulvina	Penicillium patulum	Medicină. Agricultură
Nistatina	Streptomyces noursei	Medicină
Rimocidina	Streptomyces rimosus	Medicină

I.Familia antibioticelor steroidice

Descoperirea în 1961 a acidului fusidic sau fusidina (fusidamina) produs de ciuperca Fusarium coccineum, a demonstrat existenţa antibioticelor cu structură steroidică,asemănătoare cu a colesterolului.

Fusidina este activă împotriva stafilococilor,corine-

bacteriilor şi clostridiilor.

Alte antibiotice steroidice ca pristinamicina produsă de Streptomyces lavendulae şi ferrimicina produsă de Streptomyces griseofulvus, sînt active împotriva stafilococului auriu.

3.7.3.3.Mecanismul de acţiune al antibioticelor.

Mecanismul de acţiune al antibioticelor asupra celulei bacteriene este complex şi variabil, funcţie de antibioticul considerat. Efectul poate fi bacteriostatic sau bactericid.

Acţiunea antibioticelor începe prin fixarea lor pe celulele sensibile iniţiind un lanţ de reacţii care în final duc la oprirea diviziunii (efectul bacteriostatic) sau la moartea celulei prin autoliză(efectul bactericid). După mecanismul molecular de acţiune, antibioticele pot fi clasate în cinci grupe.

I.Antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular.

(Penicilina, bacitracina, novobiocina, cicloserina, griseofulvina, vancomicina, ristocelina).

Penicilina inhibă sinteza peretelui celular fie împiedecînd transportul acidului muramic prin membrana citoplasmatică, fie inhibînd sistemul enzimatic responsabil de integrarea acidului muramic în mucopeptidele parietale. Deşi sinteza peretelui celular este oprită celula bacteriană continuă săşi sintetizeze proteinele citoplasmatice şi deci să-şi mărească dimensiunile dar fiind lipsită de perete celular ea este foarte sensibilă la variaţiile osmotice şi în final lizează. Acest mecanism explică, pe de o parte, de ce efectul bacteriostatic al penicilinei se manifestă în special asupra celulelor în faza de multiplicare logaritmică, cînd are loc sinteza peretelui celular, iar pe de altă parte neafectarea celulelor organismului animal sau uman care sînt lipsite de perete celular.

O acţiune similară au bacitracina şi novobiocina.

Cicloserina însă fiind un analog structural al alaninei împiedică încorporarea acesteia în peptidele muramice ale peretelui celular. Vancomicina inhibă, de asemenea, încorporarea acizilor aminici în peptidele muramice.

II. Antibiotice care alterează funcțiile membranei citoplasmatice (polimixinele, tirotricina, nistatina). Aceste antibiotice determină modificări fizico-chimice ale membranei traduse prin alterarea permeabilității, efect asemănător celui produs de detergenți. Acțiunea acestor antibiotice se produce indiferent dacă celulele sînt în curs de multiplicare sau nu, cît și asupra protoplaștilor.

III. Antibiotice care blochează replicarea ADN (mitomicina, porfiromicina, acidul nalidixic). Mitomicina și porfiromicinele formează punți între catenele dubluhelixului de ADN împiedecînd migrarea lor în timpul diviziunii celulare. In acest mod replicarea ADN prin ADN-polimerază, care necesită o separare totală a celor două catene devine imposibilă. In celulă se acumulează mari cantități de dezoxiribonucleotide libere și tiamină. Aceste antibiotice sînt dotate cu proprietăți antitumorale.

Acidul nalidixic pare să acționeze printr-un mecanism similar deoarece în prezența sa cantitatea de ADN bacterian scade semnificativ.

IV. Antibiotice care inhibă transcrierea informației genetice la nivelul ADN: (actinomicinele, novobiocina). Aceste antibiotice acționează prin formarea unui complex cu ADN care împiedică ca ADN să mai funcționeze ca matriță pentru transcrierea informației genetice în ARN mesager. ARN-polimeraza nu mai poate funcționa.

V. Antibiotice care împiedică traducerea ARN-mesager și sinteza proteinelor: (tetraciclinele, cloramfenicolul, macrolidele, streptomicina ș.a.). Unele dintre aceste antibiotice acționează direct asupra sintezei proteinelor la nivelul ribozomilor împiedecînd citirea codului.

Macrolidele (eritromicina, oleandomicina, etc) și tetraciclinele se fixează pe fracțiunea ribozomală 50 S împiedecînd pătrunderea sau fixarea complexului acid aminic-ARN$_t$ sau trecerea acestui complex la situsurile vecine (translocarea).

Cloramfenicolul inhibă procesul de transpeptidare, respectiv formarea legăturilor peptidice între acizii aminici.

Streptomicina și celelalte antibiotice din aceiași

familie se fixează pe fracțiunea ribozomală 30 S provocînd erori în citirea codului genetic, prin incorporarea unor acizi aminici necorespunzători informației codonilor ARN-mesager. In felul acesta se sintetizează proteine "non sens" care genetic sînt letale.

3.7.3.4. Domeniile de utilizare ale antibioticelor

Antibioticele sînt utilizate în primul rînd în terapia bolilor infecțioase umane și animale, dar terapeutica nu este unicul lor domeniu de utilizare.

In zootehnie s-a observat că animalele hrănite cu reziduri de la fabricile de antibiotice au un ritm de creștere mai accentuat decît animalele martor. Ulterior s-a constatat că administrarea penicilinei, streptomicinei, aureomicinei, teramicinei, etc., în hrana animalelor tinere, determină o sporire în greutate (10-13%). Cele mai bune rezultate s-au obținut la viței, purcei dar mai ales la păsări la care pe lîngă sporirea producției de carne s-a obținut și o sporire a celei de ouă.

Există astăzi antibiotice furajere folosite în zootehnie cu rezultate satisfăcătoare.

Mecanismul acțiunii stimulatoare a antibioticelor furajere nu este elucidat. Se crede că antibioticele ar produce o modificare a microflorei intestinale, inhibînd unele microorganisme dăunătoare care prin multiplicarea lor masivă ar putea provoca infecții subclinice ce influențează nefavorabil creșterea. Nu este exclus ca antibioticele să aibă o acțiune directă asupra țesuturilor animale stimulînd capacitatea de asimilare și determinînd o utilizare mai economică a proteinelor.

Utilizarea antibioticelor în zootehnie este însă limitată de unele fenomene indezirabile, printre care crearea rezistenței bacteriilor la acțiunea unor antibiotice folosite în terapie este cel mai important.

In industria alimentară se folosesc uneori o seamă de antibiotice ca: aureomicina, tetraciclina, cloromicetina, streptomicina și penicilina în scopul prelungirii duratei de conservare a cărnii, laptelui, peștelui, păsărilor tăiate,

vinului, etc. In general conservarea prin antibiotice se face în asociere cu conservarea la temperaturi scăzute.

Carnea de pasăre tratată în condiţii industriale,prin scufundarea într-o soluţie de 1-1,5 mg% clortetraciclină, se păstrează proaspătă un timp mai îndelungat decît carnea păsărilor netratate.

Cu mai mult succes se folosesc antibioticele în conservarea peştelui. Dacă în acest scop se foloseşte ghiaţa care conţine 0,5 micro-grame antibiotice, în special aureomicină şi teramicină care au spectru bacteriostatic larg, durata conservării peştelui proaspăt se măreşte de două ori şi se evită apariţia mirosului greu de învechit, provocat de dezvoltarea bacteriilor anaerobe. Procedeul este mai eficace daca peştele este eviscerat.

In general în industria alimentară se folosesc antibiotice nepurificate numite "alimentare", dar ele nu sînt toxice pentru consumatori deoarece prin prelucrarea termică a alimentelor se distrug. Aceste antibiotice avînd o acţiune rapidă nu permit apariţia mutanţilor rezistenţi. Cu toate acestea în unele ţări (Franţa) utilizarea antibioticelor în industria alimentară este interzisă probabil datorită pericolului de apariţie a rezistenţei încrucişate.

3.8.Originea şi evoluţia bacteriilor

Se pare că bacteriile au fost primele organisme celulare apărute pe planeta noastră, In sprijinul acestei ipoteze vin o serie de date paleomicrobiologice.

In 1915,Walcott a descris bacterii fosile(amprente de streptococi) în depozitele sedimentare din precambian. Depoziteler feroase şi calcaroase din aceiaşi epocă li se atribuie o origine microbiană. Aceasta înseamnă că bacteriile au apărut pe Pămînt cu circa 2,5 miliarde de ani în urmă.

Alţi autori, printre care Bertrand şi Renault(1892-1899), au descris micrococi şi bacili în resturile fosilelor de plante şi animale din devonian şi carbonifer. Au fost descrise chiar boli osoase de origine microbiană la fosilele dinosaurilor din permian (Renault).

Dombrovski(1962) a izolat bacterii din specia Bacillus circulans din roci saline, de la adîncimea de 400 m, vechi de 180 şi 650 milioane de ani, capabile în anumite condiţii să-şi reia activitatea vitală. Interesant este că aceste bacterii nu puteau folosi hidraţii de carbon ceea ce înseamnă că substanţele organice de acest tip nu apăruseră încă în epocile geologice respective. Ele s-au păstrat mumificate într-o stare de anabioză totală.

Referitor la evoluţia bacteriilor, după Carpenter (1965), celula bacteriană primitivă ar fi evoluat prin dobîndirea unor structuri care i-au ameliorat capacitatea de adaptare şi supravieţuire. Printre primele structuri dobîndite au fost flagelii care au permis mobilitatea bacteriilor. De la aceste celule flagelate evoluţia s-ar fi realizat pe mai multe direcţii ducînd la apariţia microorganismelor actuale, a plantelor şi animalelor.

Studiul evoluţiei bacteriilor nu se poate baza încă pe dovezi filogenetice iar încercările de a o explica sînt numai la stadiu de ipoteze.Există trei ipozete principale:

1.Ipoteza Kluyver şi Van Niel (1936). Toate tipurile morfologice de bacterii actuale derivă dintr-o formă ancestrală comună,reprezentată de un coc. Forma sferică, de coc, a primelor bacterii se explică prin faptul că în momentul constituirii celulei vii, tensiunea superficială a mediului ambiant a imprimat protoplasmei primitive o formă geometrică în care suprafaţa expusă factorilor de mediu este minimă în raport cu volumul. Tipurilr morfologice care au derivat au apărut prin deformarea celulei sferice odată cu dezvoltarea peretelui celular rigid, capabil să contrabalanseze acţiunea forţelor de suprafaţă.(Fig.nr.67).

Ulterior Stanier şi Van Niel au prezentat o schemă mai complexă, după care evoluţia bacteriilor s-ar fi făcut după 5 linii principale. (Fig.nr.68).

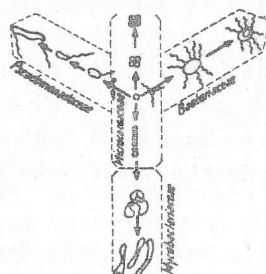


Fig.nr.67.Schema evoluţiei bacteriilor după Kluyver şi Van Niel.

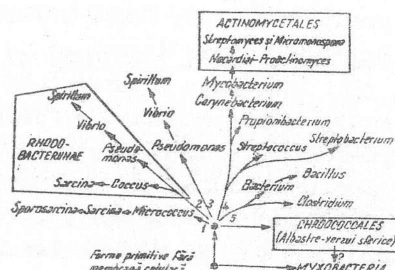


Fig.nr.68.Schema evoluţiei principalelor grupe de bacterii,după Stanier şi Van Niel.

2.Ipoteza Bisset (1957). Bacteriile primitive au fost spiralate. Evoluţia lor s-a făcut de-a lungul a două linii, prin trecerea formelor acvatice la forme terestre şi prin

modificarea metabolismului de la forme mai puţin exigente la forme mai exigente.

3.Ipoteza Lynn Sagan Margulis(1968).Este ipoteza cea mai recentă. Se presupune că din procariotele precambiene au evoluat eucariotele. Evoluţia procariotelor s-ar fi făcut după schema din fig.nr.69.

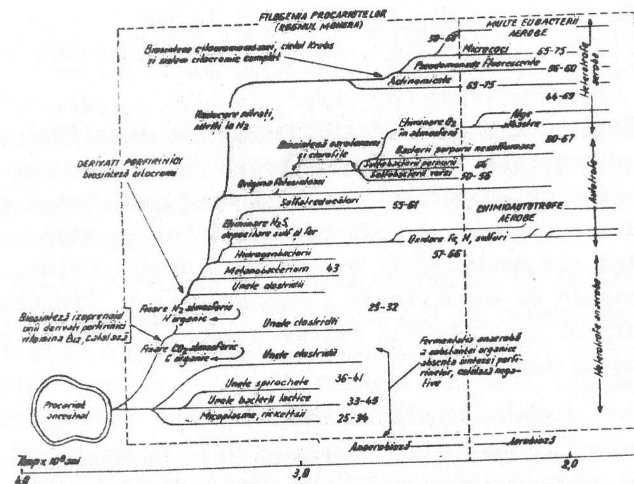


Fig.nr.69.Schema evoluţiei procariotelor după L.S.Margulis.Cifrele reprezintă raportul guanină+citozină în % din moleculele de ADN.

3.9.Taxonomia bacteriilor

Clasificarea bacteriilor întîmpină o serie de mari dificultăţi determinate de faptul că microbiologul nu studiază aceste microorganisme ca indivizi, ci ca populaţii izolate de mediul lor natural, în condiţii artificiale de laborator care nu pot reproduce niciodată condiţiile naturale. Pe de altă parte bacteriile prezintă o mare variabilitate sub influenţa condiţiilor de mediu.

Totuşi în cursul dezvoltării microbiologiei ca ştiinţă, au fost numeroase încercări de clasificare a bacteriilor (Ehrenberg 1839, Cohn 1872, Lehman şi Neuman 1927, Pribram 1933, Kluyver şi Van Niel 1936, etc.).

Societatea bacteriologilor americani, pe baza lucrărilor lui Buchanan (1916-1918) şi Winslow (1920) a stabilit un sistem de clasificare,prezentat în 1923 în prima ediţie a "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", după care au urmat încă şapte ediţii. Acest sistem este astăzi adoptat de majoritatea microbiologilor.

In Franţa, André Prevot a pus la punct un alt sistem de clasificare, iar în URSS mai este utilizat sistemul de clasificare N.Krasilnikov.

Nici unul dintre aceste sisteme nu este însă perfect, deoarece microbiologia încă nu dispune de date asupra filogeniei diferitelor grupuri şi specii bacteriene, iar o clasificare naturală trebuie să reflecte stadiile, treptele sau diferitele verigi ale dezvoltării evolutive a organismelor. Ori sistemelor actuale de clasificare a bacteriilor le lipseşte tocmai principiul constituirii filogenetice a speciilor şi grupărilor de bacterii.

3.9.1. Specia bacteriană

Problema centrală, a sistematicii bacteriene, ca de altfel şi pentru sistematica botanică sau zoologică, este specia.

Conceptul de specie răspunde unor necesităţi de ordin practic, permiţînd recunoaşterea anumitor organisme şi încadrarea lor în aceiaşi categorie împreună cu toate celelalte cu care se aseamănă. In felul acesta dispunem de un limbaj comun tuturor biologilor, eliminîndu-se repetiţia în descrierea morfo-fiziologică a organismelor studiate.

Specia bacteriană are o existenţă reală. Ea se dezvoltă după legi proprii şi se menţine în natură ca unitate caracteristică.

Cu toate acestea, noţiunea de specie bacteriană încă

nu a fost bine precizată sub raportul extinderii şi limitelor ei. Dificultatea majoră este că unul dintre criteriile fundamentale valabil pentru taxonomia animală şi vegetală, acela al fecundităţii intraspecifice şi al nefecundităţii interspecifice, nu poate fi luat în consideraţie în taxonomia bacteriană. La bacterii fenomenul de încrucişare sau recombinare genetică nu este universal, iar la speciile la care există el are cu totul alte particularităţi. Mai mult, cercetări destul de recente au arătat existenţa recombinării genetice între Escherichia coli şi Shigella dysenteriae, ceea ce ar presupune că cele două bacterii fac parte din aceiaşi specie, deşi bacteriologii le consideră specii distincte dar înrudite.

André Prevot a propus ca unitate fundamentală de clasificare clona. O clonă bacteriană reprezintă o populaţie de celule derivate pe cale asexuată, în urma unor diviziuni succesive, dintr-o singură celulă parentală. Specia ar fi reprezentată de totalitatea clonelor identice. Astfel definită, noţiunea de specie implică un înalt grad de omogenitate morfologică şi fiziologică.

Lwoff, luînd în consideraţie faptul că la bacterii fenomenele de sexualitate sînt limitate la cîteva specii,propune utilizarea conceptului de specie asexuată. Astfel specia s-ar defini drept o populaţie formată din unul sau mai multe biotipuri care se reproduc asexuat. Biotipul este, în concepţia lui Lwoff, un grup de indivizi care posedă, în esenţă, aceeaşi informaţie genetică şi, în consecinţă, este necesar asemănătoare prin marea majoritate a caracterelor.

Nici una din definiţiile formulate pînă în prezent nu satisfac toate exigenţele de ordin teoretic ceea ce explică caracterul convenţional şi subiectiv al actualelor sisteme de clasificare a bacteriilor. Din punct de vedere practic însă, unele definiţii ale speciei sînt utilizabile atunci cînd este necesară identificarea unei tulpini bacteriene.

Tulpina bacteriană reprezintă o cultură pură dintr-o specie, provenind dintr-o singură izolare din mediul natural. Ea este desemnată prin adăugarea la numele speciei a numelui persoanei care a făcut izolarea,al localităţii , a unei lite-

re sau număr convențional de laborator.

3.9.2.Criteriile de clasificare a bacteriilor.

Pentru identificarea și clasificarea bacteriilor trebuie să se ia în considerație un număr cît mai mare de caractere distincte, relativ stabile, unitare. Se iau în considerație:

a)Caractere morfologice: formă, dimensiuni, cili, capsulă, spori, comportamentul față de colorația Gram.

b)Caractere fiziologice: limitele termice de dezvoltare, de pH, rH, producerea unor anumiți metaboliți finali (alcooli, acizi,toxine).

c)Caractere de cultură:aspectul coloniilor pe medii solide, aspectul culturilor în medii lichide, exigențele nutritive și în factori de creștere.

d)Caractere biochimice: capacitatea de utilizare a diferitelor surse de carbon (glucide, alcooli), de azot, capacitatea de a se dezvolta în aero sau anaerobioză.

e)Caractere ecologice: habitatul natural și relațiile cu mediu ambiant.

f)Caractere antigenice (serologice):reacția specifică cu un ser imun omolog.

g)caractere de patogenitate:capacitatea de a produce îmbolnăvirea unui animal de laborator, virulența.

h)Sensibilitatea la bacteriofag.

Toate caracterele de mai sus pot varia între anumite limite chiar la aceiași specie, variații de care trebuie să se țină seama.

In taxonomia bacteriană actuală a început să fie luate în considerație criteriile genetice și biochimice. Astfel mai multe tulpini bacteriene pot fi incluse în aceiași specie funcție de posibilitatea realizării prin transfer genetic între ele și prin posibilitatea integrării, prin recombinare, a materialului transferat.

La nivelul molecular,gradul de înrudire genetică se

poate aprecia după conținutul în G + C(guanină+citozină) al ADN,reflectat de raportul G+C/G+C+A+T, sau GC%. La bacterii valoarea acestui raport este cuprinsă între 0,27 și 0,75. Speciile înrudite au un conținut de G+C aproape identic, Astfel genurile Escherichia, Salmonella și Shigella au un conținut de G+C aproape identic (50-52%).

Dar nici aceste criterii nu furnizează suficiente elemente esențiale ale unei clasificări naturale, In ultimele două decenii s-a încercat aplicarea în clasificarea bacteriană a taxonomiei numerice, ale cărei principii sînt:

-analiza unui număr mare de caractere (60-200) care sînt considerate cu pondere egală;

-gruparea bacteriilor în raport cu coeficientul de similitudine global;

-folosirea ca unități taxonomice a tulpinelor bacteriene.

Taxonomia numerică înlocuiește noțiunea de specie cu cea de taxospecie sau pleiston.

Pe lîngă faptul că acest tip de clasificare necesită operațiuni complicate care nu pot fi realizate decît de calculatoare electronice, însuși principiul este criticabil deoarece nu toate caracterele au aceeași pondere în identificarea și clasificarea speciilor.

3.9.3.Codul de nomenclatură al bacteriilor

Codul de nomenclatură al bacteriilor a fost stabilit de un comitet internațional instituit în urma primului Congres Internațional de Microbiologie, ținut la Paris în 1930. Codul oficial a fost publicat în anul 1948 în Analele Institutului Pasteur.

Termenii care definesc rangurile taxonomice, în ordinea lor, sînt: diviziunea(încrengătura), clasa, ordinul, familia, tribul, genul, specia și subdiviziunile fiecărui rang.

Dintre numeroasele reguli de nomenclatură redăm doar pe cele esențiale:

1.Numele diviziunii, subdiviziunii, clasei, subclasei sînt cuvinte de origine latină sau greacă. Numele ordinelor, subordinelor, familiilor, subfamiliilor, triburilor, subtriburilor sînt cuvinte latine.

2.Rangurile taxonomice sînt indicate de cîte un sufix:

-pentru ordin	-ales
-pentru subordin	-ineae
-pentru familie	-aceae
-pentru subfamilie	-oidiae
-pentru trib	-eae
-pentru sub trib	-inae

Numele rangurilor taxonomice superioare genului trebuiesc folosite la plural.

3.Numele genurilor şi subgenurilor sînt substantive sau adjective folosite ca atare. Ele trebuiesc folosite la singular şi scrise cu iniţială majusculă (Bacillus, Brucella, Clostridium, etc.). Cînd un nume de gen este atribuit unei bacterii ca omagiu adus unei personalităţi şi este format plecînd de la numele său propriu, se adaugă la acest nume:

-atunci cînd se termină într-o vocală alta decît a - -litera a (Gaffkya);

-cînd se termină în a - ca (Collaca);

-cînd se termină într-o consoană -ia (Escherichia)

-cînd se termină în er - a.Uneori numelui propriu i se adaugă o terminaţie diminutiv - ella(Pasteurella, Brucella).

4.Numele speciei este totdeauna format din două cuvinte-nomenclatură binară - care cuprinde numele genului urmat de un epitet specific, care trebuie să dea cîteva indicaţii asupra unor caractere originei sau istoriei speciei (Staphylococcus aureus, Brucella abortus, Clostridium pasteurianum). Epitetul specific poate fi format plecînd de la un adjectiv (Bacillus subtilis), de la un substantiv (Vibrio chomma)sau de la un nume propriu sau localitate(Clostridium pasteurianum) Dacă epitetul specific este format dintr-un nume propriu, el desemnează de preferinţă persoana care a descoperit

şi a descris specia. Acest nume este latinizat şi dacă e substantiv se foloseşte la genetiv. Dacă se termină în altă vocală decît a i se adaugă i (sonnei), dacă e în consoană şi se adaugă literele - ii(welchii), iar dacă se termină în er se adaugă - i(barkeri). Cînd epitetul specific este un adjectiv el se acordă simplu cu numele genului şi se va termina în us sau um. Epitetul specific se scrie cu iniţială mică chiar dacă provine de la un nume propriu(Clostridium pateurianum, Borellia kochii).

Dacă este nevoie să se indice şi subgenul din care face parte o specie, numele acestuia se plasează între numele genului şi epitetul specific, între paranteze:

Lactobacillus(Thermobacterium) caucasicus.

Pentru ca o denumire să fie completă ea trebuie să fie urmată de numele autorului care a publicat prima dată denumirea şi data acestei publicaţii. Exemplu: Serratia marcescens Bizio 1823. In cazul că această denumire a suferit ulterior o modificare importantă, atunci se adaugă modificarea şi numele autorului.

Dacă însăşi poziţia sistematică a unui gen, subgen sau specie se modifică, autorul original este citat între paranteze şi numele său este urmat de acela al autorului care a făcut modificarea. Exemplu: Spirocheta pallidum Scaudin şi Hoffman a devenit Treponema pallidum (Schaudin si Hoffman) Schaudin.

3.9.4. CLASIFICAREA BACTERIILOR

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ediţia 8-a, 1974

Regnul: PROCARIOTAE

Diviziunea I:CYANOBACTERIA

Diviziunea II: BACTERIA

Partea I.

Bacterii fotosintetizante,

Ordinul RHODOSPIRILLALES

Familia Rhodospirillacea

Familia Beggiatoaceae

Genuri: Beggiatoa
Vitreoscilla
Thioploca

Familia Simonsiellaceae

Genuri: Rhodospirillum
Rhodopseudomonas
Rhodomicrobium

Familia Chromatiacea

Genuri: Chromatium
Thiocystis
Thiosarcina
Thiospirillum
Thiocapsa
Lamprocystis
Tiodictyon
Thiopedia
Amoebobacter
Ectothiorhodospira

Familia Chlorobiacea

Genuri: Chlorobium
Prosthecochloris
Chloropseudomonas
Pelodictyon
Chathrochloris

Partea II.

Bacteriile glisante.

Ordinul MYXOBACTERALES
Familia Myxococcaceae
Genul Myxococcus

Familia Archangiaceae
Genul Archangium

Familia Cystobacteraceae
Genuri: Cystobacter
Melittangium
Stigmatella

Familia Polyangiaceae
Genuri: Polyangium
Nannocystis
Chondromyces

Ordinul CYTOPHAGALES
Familia Cytophagaceae
Genuri: Cytophaga
Flexibacter
Herpetosiphon
Flexithrix
Saprospira
Sporocytophaga

Genuri: Simonsiella
Alysiella
Familia Leucotrichaceae
Genuri: Leucothrix
Thiothrix

Familii şi genuri cu încadrare nesigură:
Genul: Toxothrix
Familia Achromatiaceae
Genul: Achromatium
Familia Pelonemataceae
Genuri: Pelonema
Achroonema
Peloploca
Desmanthos

Partea III.

Bacterii cu teacă.
Genuri: Sphaerotillus
Leptothrix
Streptothrix
Lieskella
Phragmidiothrix
Crenothrix
Clonothrix

Partea IV.

Bacterii cu muguri sau/şi apendiculate
Genuri: Hyphomicrobium
Hyphomonas
Pedomicrobium
Caulobacter
Asticcacaulis
Ancalomicrobium
Prosthecomicrobium
Thiodendron
Pasteuria
Blastobacter
Seliberia
Gallionela
Nevskia
Planctomyces
Metallogenium
Caulococcus
Kuznezovia

Partea V.

Spirochetele

Ordinul SPIROCHETALES
Familia Spirochetaceae
Genuri: Spirochaeta
Cristispira
Treponema
Borrelia
Leptospira

Partea VI.

Bacterii spiralate şi încurbate

Familia Spirillaceae
Genuri: Spirillum
Campylobacter

Genuri cu încadrare nesigură:
Bdellovibrio
Microcyclus
Pelosigma
Brachyarcus

Partea VII.

Bacili şi coci Gram-negativi, aerobi.

Familia Pseudomonadaceae
Genuri: Pseudomonas
Xanthomonas
Zoogloea
Gluconobacter

Familia Azotobacteraceae
Genuri: Azotobacter
Azomonas
Beijerinckia
Derxia

Familia Rizobiaceae
Genuri: Rhizobium
Agrobacterium

Familia Methylomonadaceae
Genuri: Methylomonas
Methylococcus

Familia Halobacteriaceae
Genuri: Halobacterium
Halococcus

Genuri cu încadrare nesigură:
Alcaligenes
Acetobacter
Brucella
Bordetella
Francisella
Thermus

Partea VIII.

Bacili Gram-negativi facultativ anaerobi.

Familia Enterobacteriaceae
Genuri: Escherichia
Edwardsiella
Citrobacter
Salmonella
Shigella
Klebsiella
Enterobacter
Hafnia
Serratia
Proteus
Yersinia
Erwinia

Familia Vibrionaceae
Genuri: Vibrio
Aeromonas
Plesiomonas
Photobacterium
Lucibacterium
Genuri cu încadrare nesigură:
Zymomonas
Chromobacterium
Flavobacterium
Haemophilus
Pasteurella
Actinobacillus
Cardiobacterium
Streptobacillus
Calymmatobacterium

Partea IX.

Bacterii Gram-Negative, anaerobe

Familia Bacteroidaceae
Genuri: Bacteroides
Fusobacterium
Leptotrichia
Genuri cu încadrare nesigură:
Desulfovibrio
Butyrivibrio
Succinivibrio
Lachnospira
Selenomonas

Partea X.

Coci şi cocobacili Gram-negativi.

Familia Neisseriaceae
Genuri: Neisseria
Branhmella
Moraxella
Acinetobacter
Genuri cu încadrare nesigură:
Paracoccus
Lampropedia.

Partea XI.

Coci Gram-negativi,anaerobi.

Familia Veiklonellaceae
Genuri: Veillonella
Acidaminococcus
Megasphaera

Partea XII.

Bacterii Gram-negative,chemolitotrofe.

a.Bacterii care oxidează NH_4 sau nitriţii.

Familia Nitrobacteraceae
Genuri:Nitrobacter
Mitrospina
Nitrococcus
Nitrosomonas
Nitrosospira
Nitrosococcus
Nitrosolobus.

b.Bacterii care metabolizează sulful.
Genuri:Thiobacillus
Sulfolobus
Thiobacterium
Macromonas
Thiovolvum
Thiospira.

c.Bacterii care depozitează oxizi de fier sau mangan.

Familia Siderocapsaceae
Genuri: Siderocapsa
Naumanniella
Ochrobium
Siderococcus

Partea XIII.

Bacterii care produc metan.

Familia Methanobacteriaceae
Genuri: Methanobacterium
Methanosarcina
Methanococcus

Partea XIV.

Coci Gram-pozitivi.

a.Aerobi şi/sau facultativ anaerobi.

Familia Micrococcaceae
Genuri:Micrococcus
Staphylococcus
Planococcus

Familia Streptococcaceae
Genuri:Streptococcus
Leuconostoc
Pediococcus
Aerococcus
Gemella.

b.Anaerobi.

Familia Peptococcaceae
Genuri:Peptococcus
Peptostreptococcus
Ruminococcus
Sarcina.

Partea XV

Bacili şi coci sporulaţi

Familia Bacillaceae
Genuri:Bacillus
Sporolactobacillus
Clostridium
Desulfomaculum
Sporosarcina.
Genuri cu încadraee nesigură:
Oscillospira.

Partea XVI.

Bacilii sub formă de bacili nesporulate,Gram-pozitive.

Familia Lactobacillaceae
Genul:Lactobacillus
Genuri cu încadrare nesigură:
Crysipelothrix
Caryaphanon

Partea XVII

Actinomycete şi bacterii înrudite

Grupul bacteriilor Coryneforme

Genuri: Corynebacterium
Arthrobacter
Genuri incerte:
Brevibacterium
Microbacterium
Genuri:Cellulomonas
Curthia

Familia Propionibacteriaceae
Genuri:Propionibacterium
Eubacterium

Familia Actinomycetaceae+
Familia Mycobacteriaceae+
Familia Frankiaceae+
Familia Actinoplanaceae+
Familia Dermatophilaceae+
Familia Nocardiaceae+
Familia Streptomycetaceae+
Familia Micromonosporaceae+

Partea XVIII

Rickettsiile.

Ordinul Rickettsiales+
Ordinul Chlamydiales+

Partea XIX.

Mycoplasmele.Clasa Mollicutes

Ordinul Mycoplasmatales+
Genuri cu încadrare nesigură:
Thermoplasma
Spiroplasma.

4.MIXOBACTERIILE

Mixobacteriile sînt bacili Gram negativi caracterizaţi de două proprietăţi esenţiale: deplasarea sau mobilitatea prin glisare şi capacitatea de a forma corpi de fructificare.

Mobilitatea glisantă se realizează ori de cîte ori celulele vin în contact cu un suport solid şi pare să fie similară cu mobilitatea cyanobacteriilor şi a altor bacterii glisante (Beggiatoa).

Formarea corpilor de fructificare, în anumite condiţii fizice şi nutriţionale, reprezintă un fenomen unic în lumea bacteriilor. Celulele vegetative se adună formînd agregate celulare care apoi se transformă în structuri mai mult sau mai puţin complexe, cu morfologie foarte variată,numite "corpi de fructificare".(Fig.nr.7o).Celulele corpilor de fructificare diferă de celulele vegetative printr-o rată metabolică joasă şi printr-o mai mare rezistenţă la condiţiile de mediu. Ciclul vital la mixobacterii este ilustrat de fig.71 A.

Formarea corpilor de fructificare este sub directa influenţă a mediului nutritiv. Mediile nutritive bogate favorizează dezvoltarea celulelor vegetative în timp ce mediile carenţate induc formarea corpilor de fructificare. Un mediu de cultură determinat care asigură o dezvoltare exponenţială a speciei Myxococcus xanthus ,poate induce formarea corpilor

+)Ordine şi familii a căror taxonomie este prezentată în alte capitole.

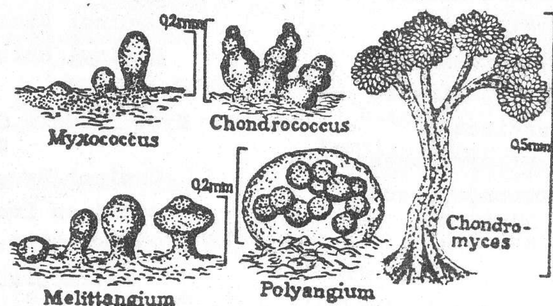


Fig.nr.70.Corpi de fructificare la mixobacterii.

de fructificare prin îndepărtarea triptofanului şi fenilalaninei, ceea ce sugerează că lipsa unor acizi aminici în mediile de cultură sau în mediile naturale, induce formarea corpilor de fructificare.(Dworkin 1963, Hemphill şi Zahler 1968).Mecanismul prin care celulele vegetative se agregă în corpi de fructificare nu este încă cunoscut.

Complexitatea structurală a corpilor de fructificare diferă. La speciile genului Myxococcus corpii de fructificare au o structură simplă fiind constituiţi dintr-o proeminenţă piriformă care include celulele vegetative într-o matrice mucoasă. La Chondromyces şi Stigmatella structura este mai complexă, corpii de fructificare avînd forma unor tulpiniţe sau chistofor purtătoare de chişti(mixochişti).

Obişnuit viu pigmentaţi corpii de fructificare reprezintă stadiul de rezistenţă, de aşteptare(resting stage) în ciclul de viaţă al mixobacteriilor. In condiţii favorabile de nutriţie şi umiditate celulele de rezistenţă(resting cells) sau mixochiştii vor germina dînd naştere la alte celule vegetative.

Celulele vegetative sînt bacilare, alungite(0,8-1,2 x 2,5-6 μ) cu capetele turtite la Chondromyces şi Sorangium şi subţiri, helicale la Cystobacter şi Stigmatella. Structural ele nu se deosebesc fundamental de celulele bac-

teriilor Gram negative ci doar conţin cantităţi mai mici de mureină(peptidoglican).

Mixochiştii (celulele de aşteptare sau rezistenţă)sau mai corect mixosporii reprezintă celule care apar în ciclul de dezvoltare al mixobacteriilor în corpii de fructificare şi care sînt dotate cu proprietăţi de rezistenţă. La mixobacterii întîlnim două tipuri de mixospori. Unii sînt rotunzi, capsulaţi, refringenţi şi sînt întîlniţi la Myxococaceae, iar ceilalţi de forma unor bacili scurţi,nerefringenţi şi lipsiţi de capsulă specifici pentru familia Archangiaceae. Deşi mai puţin rezistenţi decît endosporii, mixosporii sînt mai rezistenţi la temperatură, uscăciune, radiaţii UV şi alţi factori decît celulele vegetative.

Din punct de vedere nutriţional mixobacteriile sînt heterotrofe aerobe. Ele pot hidroliza o mare varietate de macromolecule insolubile dar în mod obişnuit nu pot utiliza zaharurile. Necesită o sursă organică de azot dezvoltîndu-se bine pe medii cu hidrolizate enzimatice de proteine. Unele specii nu se dezvoltă în medii lichide. Creşterea pe medii solide este dependentă de concentraţia acestora în substanţe nutritive. Unele genuri sînt celulozolitice(Sorangium).

Mixomicetele sînt ubicuitare în sol, în nămolurile apelor dulci şi marine,pe diferite resturi vegetale în descompunere(lemn).Rolul lor în circuitul materiei în natură este incontestabil datorită capacităţii de a hidroliza macromolecule ca celuloza, chitina, amidonul, peptidoglicanul.etc.

Capacitatea mixobacteriilor de a agrega şi a forma corpi de fructificare multicelulari este considerată ca o trecere de la viaţa unicelulară la modul de viaţă multicelular,mixomicetele reprezentînd cea mai simplă şi primitivă comunitate de viaţă organizată cunoscută(Dworkin 1973).Ciclul lor de viaţă este analog ciclului vital de la unele ciuperci primitive(Achrasiae). Diferenţele, în organizarea celulară între aceste grupe arată că nu există relaţii evolutive între ele ci numai un strîns paralelism. Aceste cicluri reprezintă un foarte bun exemplu de evoluţie convergentă, respectiv dobîndirea,prin selecţie naturală, a unor proprietăţi biologice similare la două

grupe total diferite.(Fig.nr.71 A şi B).

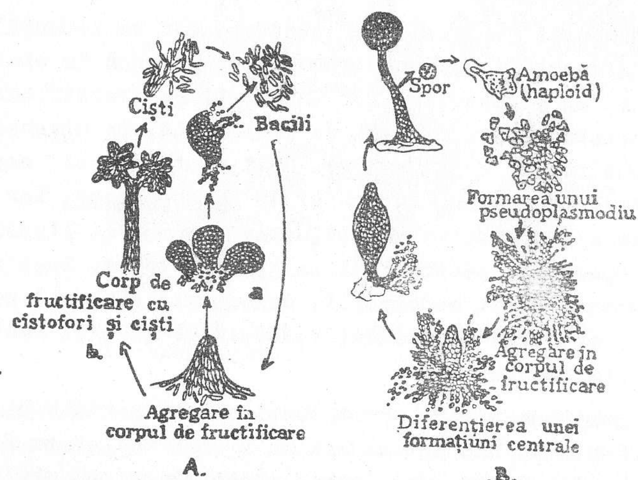


Fig.nr.71.Ciclurile de dezvoltare la Myxobacterii şi la Acrasiale.
A.Myxobacterii: a)Myxococcus;b)Chondromyces.
B.Acrasiales: Dictyostelium.

După Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed.8-a 1974, mixobacteriile formează Ordinul Myxobacterales cu patru familii:

a)Fam.Myxobocaceae: Myxococcus fulvus.
b)Fam.Archangiaceae:Archangium gephyra
c)Fam.Cystobacteraceae: Cystobacter fuscus
Melittangium
Stigmatella
d)Fam.Polyangiaceae: Polyangium vitellinum
Nannocystis
Chondromyces

5.SPIROCHETELE

Spirochetele sînt bacterii Gram negative, unicelulare, subţiri, flexuase, helicale cu mai multe ture de spiră, cu o lungime cuprinsă între 5 şi 500 µm şi o grosime de numai 0,1 pînă la 3 µm.

Dimensiunile mici fac dificilă observarea lor la microscopul fotonic dar pot fi observate în contrast de fază sau la microscopul cu cîmp întunecat(ultramicroscop). Din aceleaşi cauze ele străbat filtrele impermeabile pentru majoritatea bacteriilor.

Spirochetele se deosebesc de celelalte bacterii şi prin alte caractere. Nu sînt sporulate, nu pigmentează şi prezintă unele particularităţi structurale.

Cercetările electronomicroscopice au evidenţiat în celula spirochetelor trei structuri principale: membrana externă, cilindrul protoplasmic şi filamentul axial dispus între ele. Membrana externă este tristratificată şi are o grosime de 80-140 Å . Cilindrul protoplasmic este acoperit tot de o membrană tristratificată groasă de 80-100 Å. Intre aceste două formaţiuni se află filamentul axial, flexibil,constituit dintr-un sistem de fibrile contractile inserate de capetele celulei în jurul căreia se înrulează, prin nişte formaţiuni butonate. Tratarea spirochetelor cu tripsină îndepărtează membrana externă astfel încît filamentul axial rămîne liber. Structura şi numărul fibrelor filametului axial variază la diferite specii şi genuri. La leptospire filamentul axial numit şi axistil are un diametru mai mare decît la alte spirochete şi este format din două fibre incluse într-o teacă comună. La alte spirochete (Spirochaeta, Treponema,Borrelia) filamentul axial conţine cîteva zeci de fibre fără a prezenta un înveliş extern care să le lege unele de altele. La Cristispira filamentul axial poate conţine de la 50 pînă la cîteva sute de fibre. De altfel acest gen îşi datoreşte numele de la faptul că fascicolul gros de fibre ale filamentului axial formează o creastă înrulată în jurul celulei, observabilă la microscopul fotonic. Ruperea filamentului axial în regiunea mijlocie antrenează pierderea formei helicale a spirochetelor dar fibrele filamentului rămîn fixate de capetele celulei dîndu-i aspectul de celulă ciliată bipolară. Acest fapt sugerează că filamentul axial determină forma helicală a spirochetelor.

In culturi vechi de spirochete se pot observa formaţiuni anormale, aberante, granulare, cocoide sau sferoide,cu

diametrul de 3-5 μm. Acestea apar ca urmare a dizolvării membranei externe şi acumulării de apă intracelular.Corpul celular rămîne neschimbat, sferoizii reprezentînd forme de degenerare şi nu un stadiu al unui ciclu de dezvoltare. Asemenea formaţiuni apar şi în urma tratării spirochetelor cu penicilină.

Datorită filamentului axial, spirochetele se deplasează prin mişcări serpentiforme. Ele se multiplică prin diviziune directă. Diviziunea celulară implică mai întîi diviziunea protoplastului urmată apoi de diviziunea membranei externe şi separarea celulelor surori. Fiecare celulă va prezenta un set de fibre care vor forma filamentul axial.

Spirochetele cuprind specii aerobe şi anaerobe. Unele trăiesc în stare liberă, saprofite, în natură, altele sînt parazite şi patogene pentru om şi animale.

După Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed.8-a, 1974, spirochetele constituie ordinul Spirochaetales, cu 5 genuri:Spirochaeta, Cristispira, Treponema, Borrelia şi Leptospira.

Genul Spirochaeta cuprinde specii saprofite, anaerobe sau facultativ anaerobe. S.plicatilis este acvatică întîlnindu-se în zonele de apă şi nămol în care întîlnim şi bacteriile fotosintetizante. S.litoralis este anaerobă şi marină. Alte specii: S.stenostrepa, S.zuelzerae, S.aurantia.

Genul Cistispira cuprinde specii întîlnite în tubul digestiv al moluştelor dulcicole şi marine(Anodonta,Pecten); Cristispira pectinis, C.hartmanii.

Genul Treponema cuprinde specii mici,anaerobe,întîlnite în cavitatea bucală, tubul digestiv şi regiunea organelor genitale la om şi animale. Unele specii sînt patogene,Specia tip este Treponema pallidum agentul etiologic al sifilisului la om. Alte specii patogene: T.pertenue, T.carateum, T.paralues-cuniculi(sifilisul la iepure). Specii saprofite: T.microdentium, R.commondénii, T.ambiguum, ş.a.

Genul Borrelia cuprinde spirochete mici, anaerobe, parazite la artropode,vertebrate şi om. Specia tip Borrelia recurentis produce la om febra curentă transmisă prin păduche. Alte specii: B.hispanica, B.microti, B.dipodilii , B.brasiliensis, B.turkmenica, B.caucasica, B.persica, ş.a.

Genul Leptospira. Leptospirele sînt cele mai mici spirochete, aerobe, unele saprofite, altele parazite şi patogene pentru om şi animale. Genul cuprinde două specii, una saprofită şi alta parazită.

Leptospira biflexa, saprofită, întîlnită în apele dulci.

Leptospira interrogans, parazită-patogenă cuprinde mai multe serotipuri dintre care Leptospira icterohemoragiae este agentul etiologic al icterului infecţios la om. Alte serotipuri: L.pomona, L.canicola ş.a. Acestea se transmit prin apă şi alimente, ajung în sînge şi organe (ficat,rinichi,etc.) unde provoacă disfuncţii şi hemoragii ce duc la apariţia icterului.

6.ACTINOMICETELE

Actinomicetele reprezintă un grup de microorganisme miceliene cu o poziţie taxonomică extrem de controversată. Descrise iniţial ca ciuperci, datorită miceliului lor cu structură similară miceliul fungic, actinomicetele au fost considerate apoi ca un grup intermediar între bacterii şi ciuperci. Cercetări moderne au arătat însă că actinomicetele sînt procariote, posedă un perete celular de tip bacterian, sînt sensibile la lizozim şi la fagi specifici(actinofagi),sensibile la antibioticele antibacteriene şi rezistente la antibioticele antifungice. Aceste caractere au determinat încadrarea actinomicetelor printre bacterii, ca bacterii miceliene.

Habitat. In marea lor majoritate saprofite, actinomicetele au fost întîlnite, cu o frecvenţă mai mare sau mai mică, în cele mai variate biotopuri, dar populaţiile cele mai dense se întîlnesc în sol. Mai puţin numeroase decît bacteriile, dar mai numeroase decît ciupercile, actinomicetele reprezintă, după unii autori, aproximativ 25% din microflora solului. Taber, în 1960, găseşte în solurile fertile din diferite regiuni ale globului, 5×10^6 actinomicete pe g de sol din straturile superficiale aerate, numarul lor scăzînd spre profunzime. Ele preferă solurile neutre sau alcaline, sînt

puţin numeroase în solurile acide sau lipsesc din tundra arctică şi tundra nord-suedeză sau în solurile Marelui Deşert Sărat din S.U.A. Speciile termofile se găsesc în bălegar iar unele specii sînt acvatice. Se cunosc numai cîteva specii parazite-patogene pentru plante, animale şi om.

In sol actinomicetele îndeplinesc cel puţin trei roluri: descompun substanţele organice, contribuie la formarea structurii solului şi sînt răspunzătoare de mirosul caracteristic al solului.

Morfologie şi structură. Caracteristica morfologică a actinomicetelor este miceliul lor format din hife subţiri, lungi, drepte sau curbate, ramificate, cu diametrul de 0,3 pînă la 1,3 μ , în general neseptate.(Fig.nr.72).Miceliul

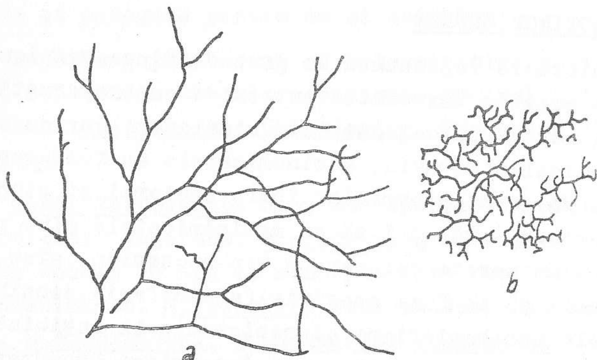


Fig.nr.72.Miceliul la Actinomycete.

actinomicetelor formează o singură celulă.

In sol sau cultivate în medii lichide miceliul unor specii se fragmentează dînd naştere la celule cu aspect bacilar sau cocoid.

In general, sînt imobile, cu excepţia Actinoplenaceelor şi a altor cîteva specii şi sînt sporogene.

Structura internă a actinomicetelor este foarte asemănătoare bacteriilor. Citoplasma miceliului tînăr este omogenă dar pe măsură ce îmbătrîneşte ea se diferenţiază în

sensul că apar incluziunile metacromatice, picături lipidice şi vacuolele. Ele au nucleu (material nuclear) de tip procariot. In hifele miceliene numărul nucleoizilor este variabil, dar sporii conţin numai un singur nucleoid. In hifele îmbătrînite nucleoizii formează aglomerări amorfe.

Mitocondriile lipsesc dar membrana citoplasmatică prezintă mezozomi lamelari, veziculari sau tubulari. De asemenea, lipseşte reticulul endoplasmatic cu poliribozomi.

Peretele celular este de tip bacterian. Actinomicetele sînt gram pozitive şi majoritatea speciilor prezintă acido-rezistenţă.

Fiziologia actinomicetelor. Pe mediile de cultură solide, miceliul actinomicetelor formează colonii dense, cartilaginoase sau piloase, foarte aderente de substrat. La cele mai multe specii pe acest miceliu de substrat se formează un miceliu aerian pe hifele căruia se găsesc sporoforii cu spori.

Sporoforii, prin formă şi structură, sînt caracteristici diferitelor specii şi au valoare taxonomică. La unele specii sînt spiralaţi, cu spire lungi sau scurte, laxe sau comprimate, închise sau deschise, la altele sînt lungi, uşor încurbaţi sau drepţi.(Fig.nr.73).

Sporii la actinomicete sînt sferici, ovali, alungiţi sau cilindrici cu extremităţile retezate. Pe suprafaţa lor sporii prezintă diferite ornamentaţii: ţepi, butoni, negi, peri sau sînt netezi. Sporii se formează prin fragmentare sau segmentare. In primul caz citoplasma sporoforului se divide în fragmente care se condensează treptat, se rotunjesc şi acoperindu-se cu o membrană proprie se transformă în spori. Aceştia vor fi puşi în libertate prin ruperea membranei sporoforului.(Fig.nr.74). In cazul segmentării, în sporofori apar mai întîi mai multe celule care la maturitate se separă, se rotunjesc şi devin spori.(Fig.nr.75).

Prin germinare sporii dau naştere unui nou miceliu. Mai întîi pe spor apare un mugure care se alungeşte treptat formînd un filament. Acesta se ramifică, continuă să crească,

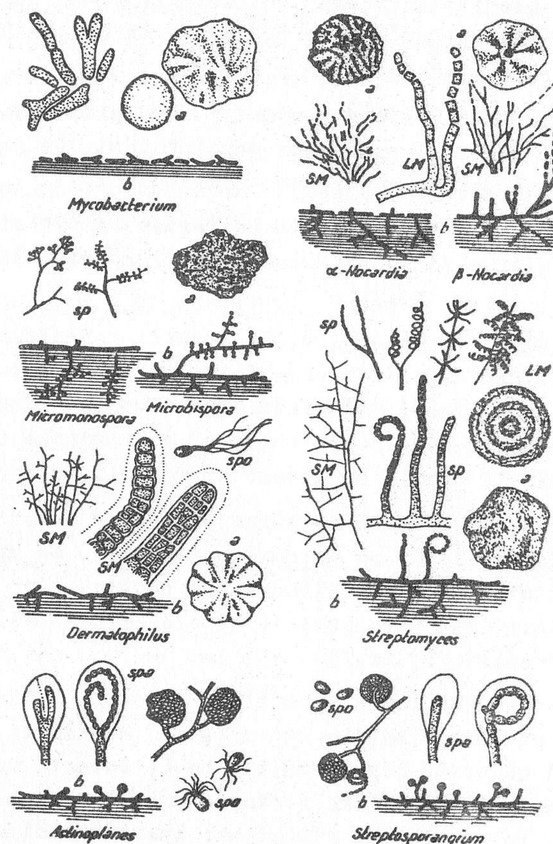


Fig.nr.73. Actinomycete.

a:colonii; b: miceliu de substrat; SM: diferite forme ale miceliului de substrat; LM:diferite forme ale miceliului aerian; sp: sporofori; spa: sporangi; spo: spori.

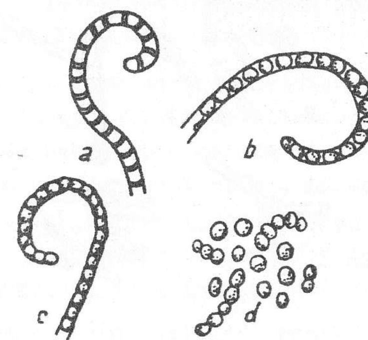


Fig.nr.74.Formarea sporilor prin fragmentare şi eliberarea lor.

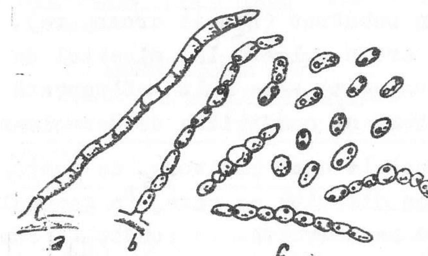


Fig.nr.75.Formarea sporilor prin segmentare şi eliberarea lor.

iar ramificaţiile împletindu-se constituie miceliul de substrat şi o nouă colonie.(Fig.nr.76).

Spre deosebire de bacterii, actinomicetele cresc sub formă de colonii şi în mediile lichide. Pe astfel de medii, cultivate în profunzime, cele mai multe specii nu mai formează spori. In aceste condiţii miceliul se fragmentează în celule mici, bacilare sau cocoide.

Marea majoritate a speciilor produc pigmenţi. Speciile pigmentate au miceliul aerian colorat în: galben, portocaliu, roşu, violet, albastru, verde, cenuşiu. Uneori numai coloniile sînt colorate (specii cromofore), alte ori pigmen-

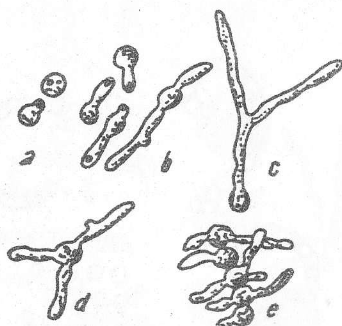


Fig.nr.76.Germinarea sporilor la actinomicete. a: stadiul inițial al germinării; b,c,d: formarea tubului de germinare; e:creșterea filamentului și ramificarea.

tul difuzează în substrat (specii cromopare). In unele cazuri miceliul aerian are o culoare iar miceliul de substrat altă culoare. Pigmentogeneza este mult influențată de compoziția mediului de cultură și condițiile de dezvoltare.

Actinomicetele sînt omnivore. Se dezvoltă pe substraturi organice diferite pe care, în general, bacteriile și ciupercile nu se dezvoltă. In condiții naturale,în cazul descompunerii resturilor vegetale, ele încep să se dezvolte după ce bacteriile și ciupercile și-au încetat dezvoltarea, respectiv atunci cînd toate substanțele ușor metabolizabile au fost descompuse și asimilate. Caracterul lor omnivor și exigențele nutritive relativ reduse explică larga lor răspîndire în natură.

Unele specii sînt chitinolitice, altele descompun lignina, celuloza, taninurile, cauciucul, hidrocarburi, fenoli, parafine, etc.

Pe mediile de cultură artificiale, actinomicetele produc substanțe biologic active: vitamine(B_1,B_2,B_6,B_{12} ș.a.) enzime dar mai ales antibiotice. Peste 50% dintre actinomicetele izolate din sol produc substanțe antibiotice, iar circa 60% dintre antibioticele cunoscute sînt produse de actinomicete.

Taxonomie. După Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ediția 8-a 1974, actinomicetele formează ordinul Actinomycetales cu 8 familii:(tabel nr.26).

Pe lîngă rolul pe care actinomicetele îl au în sol și bazinele acvatice, participînd la mineralizarea substanțelor organice, acest grup de bacterii miceliene este deosebit de important pentru industria de antibiotice, în mod deosebit genul Streptomyces. Astfel Streptomyces griseus produce streptomicina, Streptomyces lavendulae și Streptomyces venezuelae -cloromicetina, Streptomyces aureofaciens-aureomicina,etc.

Alți reprezentanți sînt patogeni pentru plante, amimale sau om. Streptomyces scabies produce rîia comună la cartofi, Actinomyces bovis produce infecții viscerale la bovine, Mycobacterium tuberculosis produce tuberculoza umană și animală (bovine,păsări), Mycobacterium leprae este agentul etiologic al leprei.

Tabel nr.26
ORDINUL ACTINOMYCETALES

Familia	Caracteristici	Genul	Specii
1	2	3	4
Actinomycetaceae	nu formează miceliu adevărat, dar pot să apară filamente ramificate;celulele sînt bacilare, difteroide;nu formează spori;anaerobe sau aerobe.	1.Actinomyces	A.bovis,A.israelii A.odontoliticus A.viscosus
		2.Arachnia	A.propionica
		3.Bifidumbacterium	B.bifidum B.adolescentis B.infantis B.breve
		4.Bacterionema	B.matruchotii
		5.Rothia	R.deutocariosa
Mycobacte-	nu formează miceliu alcoolo-acido rezistente	1.Mycobacterium	3o specii M.tuberculosis M.leprae M.phlei M.smegmatis

1	2	3	4
Frankiaceae	formează miceliu veritabil;formează noduli pe rădăcinile plantelor neleguminoase(6 ordine,7 familii şi 14 genuri de dicotiledonate);fixează N molecular;prezintă un stadiu liber în sol ;	1.Frankia	F.alni F.elaeagni F.cerocarpi,etc. lo specii
Actinoplanaceae	miceliu adevărat; formează spori în sporangi;saprofite sau facultativ parazite;	1.Actinoplanes	A.armeniacus A.philipinensis A.missouriensis
		2.Spirillospora	S.albida
		3.Streptosporangium	S.roseum S.vulgare S.album,etc. 11 specii
		4.Amorphosporangium	A.amanticular
		5.Ampulariella	A.regularis A.lobata,etc.
		6.Pilimelia	P.anulata
		7.Planomonospora	P.parantospora P.venezuelensis
		8.Planobiospora	P.longispora
		9.Dactilosporangium	D.aurantiacum
		lo.Kitasatoa	K.purpurea K.diplospora
Dermatophilaceae	miceliu aerian obişnuit lipseşte; filamentele miceliene se divid transversal în cel puţin două planuri formînd o masă de elemente cocoide mobile ;	1.Dermatophilus	D.congolensis
		2.Geodermatophilus	G.obscurus
Nocardiaceae	filamentele miceliene se fragmentează în elemente bacilare sau cocoide imobile;	1.Nocardia	N.brasiliensis N.paraffinae,etc. 31 specii

1	2	3	4
	ocazional se produc spori aerieni	2.Pseudonocardia	P.termophila P.spinosa
Streptomycetaceae	miceliu filamentos; obişnuit prezintă miceliu aerian cu lanţuri lungi de spori ;	1.Streptomyces	S.griseus S.rimosus S.aureofaciens, etc. (463 specii)
		2.Streptoverticillium	S.baldacii S.fervens
		3.Sporichthya	S. polimorpha
		4.Microcllobospira	M.cinerea M.violacea
Micromonosporaceae	miceliu filamentos; nu fragmentează; spori izolaţi,în perechi sau lanţuri scurte,atît pe miceliu aerian cît şi pe miceliu de substrat ;	1.Micromonospora	M.chalcea M.purpurea M.carbonacea, etc.
		2.Thermoactinomyces	T.vulgaris T.sacchari
		3.Actinobifida	A.dichotomica A.alba,etc.
		4.Thermomonospora	T.curvata T.viridis,etc.
		5.Microbiospora	M.bispora M.cromogenes M.parva,etc.

7.RICKETTSIILE

Multă vreme considerate ca microorganisme cu o poziţie taxonomică intermediară între bacterii şi virusuri,richettsiile sînt, în prezent incluse printre bacterii. Numele grupului a fost dat de Da Rocha Lima (1916) în onoarea cercetătorului american H.Ricketts care le-a descoperit(1909 studiind febra pătată a Munţilor Stîncoşi).

Rickettsiile, morfologic se prezintă sub formă de coci sau bacili, de dimensiuni inferioare bacteriilor obişnuite (300-600 µm). Celula lor posedă ambele tipuri de acizi nucleici, ca şi bacteriile adevărate. Au un echipament enzimatic în mare măsură asemănător cu cel al celulelor bacteriene. Peretele lor celular este rigid, mureinic şi e lizat de lizozim. Sînt imobile, nesporulate şi nu se colorează prin metoda Gram ci numai prin coloraţii speciale. Sînt sensibile la

antibiotice.

Rickettsiile sînt parazite intracelular şi nu se pot reproduce în afara celulelor animale. In celulele parazite se reproduc prin sciziparitate transversală. Pot fi cultivate prin inoculare pe ou de găină embrionat sau la animale sensibile.

Multe specii sînt patogene pentru om şi animale. Bolile produse se numesc rickettsioze sau febre exantimatice.

Rezervorul natural al rickettsiilor îl constituie artropodele hematofage (păduchii, puricii, căpuşele, etc.) care joacă şi rolul de vectori în transmiterea speciilor patogene la om sau animale. Aria de răspîndire a unor rickettsioze este condiţionată de aria de răspîndire a vectorilor respectivi.

Intre rickettsiile patogene şi artropodele vectoare se pot stabili diferite tipuri de relaţii, care depind de gradul lor de adaptare, determinat filogenetic. In unele cazuri infecţia insectei poate fi letată(Rickettsia prowazäkii la păduce) sau perfect tolerată (Rickettsia mooseri la pureci).Alte ori adaptarea rickettsiilor este atît de perfectă încît se găsesc ca simbionţi intracelulari la unele specii de artropode.

După Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ediţia 1974, rickettsiile fac parte din ordinul Rickettsiales, cu trei familii:

-Familia Rickettsiaceae cu genurile:Rickettsia, Rochalimaea, Coxiella ş.a.

-Familia Bartonellaceae, cu genurile: Bartonella şi Grahamella.

-Familia Anaplasmataceae cu genurile: Anaplasma, Paraanaplasma şi Haemobartonella.

Principalele specii patogene pentru om şi animale sînt consemnate în tabelul nr.27.

Tabel nr.27

Principalele specii de rickettsii patogene pentru om.

Specia	Boala	Aria geografică	Vector	Rezervorul natural
1	2	3	4	5
Rickettsia prowazekii	Tifosu' exantematic epidemic.	Europa,Asia, America.	Pediculus humanus var. corporis	Omul
Rickettsia mooseri.	Tifosul murin.	Nelimitată	Purici Xenopsilla cheopsis, X.astia, Polyplax spinulosa	Şobolanul, şoarecele de cîmp.
Rickettsia rickettsii.	Febrele pătate.Febra pătată a Munţilor Stîncoşi.Tifosul de Sao Paulo.	America de N. America de S.	Căpuşe: Dermacentor audersoni. D.variabilis Rhipicephalus sangvineus. Ixodes dentatus.	Iepuri,rozătoare mici, cîini.
Rickettsia conori.	Febra butunoasă(de Marsillia), tifosul indian.	Litoralul mediteranian, India,Asia centrală, Africa.	Rhipicephalus sangvineus. R.appendiculatus	Cîine, rozătoare.
Rickettsia quintana	Febra de transee.	Europa în primul şi al doilea război mondial	Pediculus humanus	?
Rickettsia tsutsugamushi.	Febre tsutsugamushi	Extremul orient, India,Indonezia,Filipine, Australia.	Molii: Trombicula akamushi. T.deliensis T.palida	Rozătoare Păsări ?
Coxiella burneti.	Febra Q.	Nelimitat	Căpuşe: Haemaphysalis hnmerosa, Ixodes holocyclus. Dermacentor andersoni.	Omul, păsări ?

8. CHLAMIDIILE

Chlamidiile reprezintă un grup de bacterii asemănătoare rickettsiilor dar parazite şi patogene numai la vertebrate, în deosebi la păsări, mamifere şi om. Spre deosebire de rickettsii ele nu se transmit prin vectori din grupul nevertebratelor ci direct.

Morfologie. Prezintă celule mai mult sau mai puţin sferice şi mai mici decît a rikettsiilor. Diametrul lor variază de la 0,2 pînă la 0,7 μ.

Structura. Celula prezintă ambii acizi nucleici. Raportul ARN/ADN este aproape egal cu 1. ADN are o greutate moleculară de 4×10^8 daltoni, aproape dublă decît la virusul vaccinal şi de 10 ori mai mică decît la Escherichia coli. Compoziţia în baze este de 29% G.C.

Peretele celular are o compoziţie identică cu cea de la bacterii. Conţine acid muramic şi D-alanină.

Chlamidiile posedă un echipament enzimatic dar acesta este incapabil să realizeze un metabolism energetic propriu.

Din cauza dimensiunilor foarte mici a fost greu să se stabilească cu certitudine modul lor de dezvoltare în celula gazdă. Au existat unele controverse în ce priveşte modul de multiplicare: sciziparitate sau înmugurire. Cercetări recente electronomicroscopice au dovedit existenţa diviziunii directe, simple, iar la genul Chlamidia s-a descris un ciclu de multiplicare (Fig.nr.77).

In ciclul de multiplicare de la genul Chlamidia se pot observa două tipuri celulare:

-celule mici, dense, relativ rezistente la uscăciune constituind elementele de răspîndire şi

-celule mai mari, mai puţin dense, care se divid prin diviziune directă, reprezentînd forma vegetativă.

Cînd chlamidia pătrunde în celula gazdă, cu toate că îşi schimbă forma, ea rămîne o unitate de structură, se măreşte şi îşi începe multiplicarea prin diviziune. După un număr de diviziuni, celulele vegetative se transformă în celule

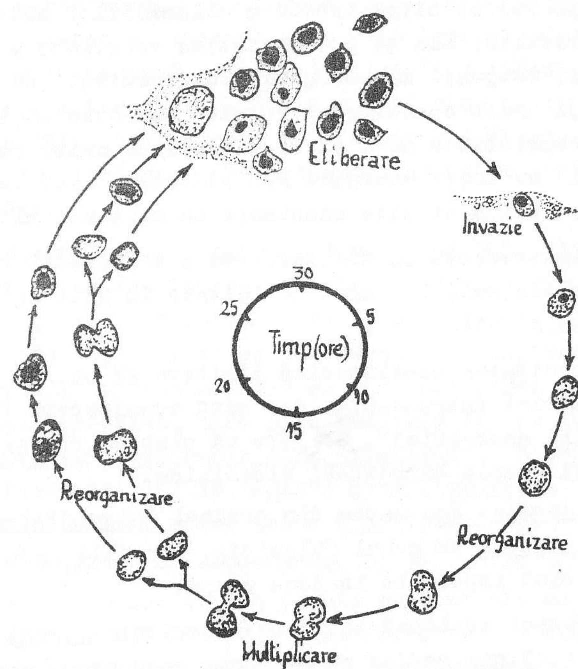


Fig.nr.77. Ciclul de multiplicare la genul Chlamidia.

mici, dense, care se eliberează după dezintegrarea celulei gazdă şi infectează alte celule. Durata unei generaţii este de 2-3 ore.

Multă vreme chlamidiile au fost considerate virusuri mari. In prezent acest grup de bacterii pune probleme importante nu numai ca agenţi etiologici ai unor boli ci de evoluţie. Ele sînt bacterii pentru că au perete celular de tip bacterian şi sînt sensibile ca şi acestea la penicilină şi alte antibiotice. Cînd infecţiile produse de chlamidii sînt tratate cu penicilină ele se transformă în sferoplaşti rezistenţi la variaţiile de presiune osmotică deoarece celulele gazdă îi protejează.

Au fost izolați și mutanți rezistenți la penicilină. Prezența D-alaninei în peretele celular face ca ele să fie sensibile și la cicloserină, analog structural al D-alaninei.

Capacitatea biosintetică a chlamidiilor este inferioară rickettsiilor. Ele nu pot sintetiza substanțe macroergice de tip ATP. Compușii macroergici sînt furnizați de celula gazdă ca și unele coenzime și anumite molecule organice mari. Au însă proprietatea de a oxida glucoza pe calea pentozofosfaților dar nu obțin energie. Pot sintetiza acid folic, D-alanină, lizină și alte substanțe cu moleculă mică.

O interesantă particularitate a chlamidiilor este aceia că proteinele lor sînt deficitare în unii acizi aminici ca arginina și histidina.

Capacitatea biosintetică limitată le obligă la un parazitism strict intracelular dar sînt considerate în special ca "paraziți energetici". Se pare că sînt microorganismele cu cele mai simple capacități biochimice.

Taxonomie. Fac parte din ordinul Chlamidiales, familia Chlamidiaceae cu genul Chlamidia. Speciile genului Chlamidia sînt împărțite în două grupe:

1.Grupul ornitoză-psitacoză-pneumonie: C.ornitosis, C.psittacii, C.pneumoniae și C.bronhopneumoniae. Acestea produc ornitoza și psitacoza la păsări, pneumonia și bronhopneumonia la mamifere. Se transmit și la om producînd aceleași boli care dacă nu beneficiază de un tratament adecvat au sfîrșit letal.

2.Grupul limfogranulomatoză-trahom-conjunctivită: C.lymphogranulomatosis, C.trachomatis și C.conjunctivae. Limfogranulomatoza veneriană (boala lui Nicolas-Favre) se caracterizează prin leziuni genitale și adenopatii supurative satelite. Trahomul este o boală gravă a corneii și conjunctivei. Conjunctivita cu incluziuni este o boală benignă, ușoară. Toate aceste boli sînt specific umane.

9.MICOPLASMELE SI FORMELE "L".

Micoplasmele sînt bacterii lipsite de perete celular, considerate ca cele mai mici entități celulare înzestrate cu activitate biochimică, funcțională și de reproducere independentă. Reprezentanții acestui grup sînt larg răspîndiți în natură (sol, ape, resturi vegetale) și au fost izolați frecvent de la animalele homeoterme. Unele specii sînt patogene pentru bovine și păsări iar o specie este implicată în etiologia pneumoniei atipice umane. S-au descris și specii patogene pentru plante.

Descoperirea micoplasmelor este atribuită lui L.Pasteur în legătură cu boala pleuropneumonia bovinelor. Agentul acestei infecții, desemnat inițial prin abreviația "PPO"(pleuropneumonia organism) a fost apoi observat și cultivat de Nocard și Roux. După 1941 s-au descris și alte organisme asemănătoare, parazite sau saprofite, care prin analogie cu PPO au fost denumite PPLO(pleuro-pneumonia like organisms). In 1955 Freudt a propus încadrarea lor în ordinul Mycoplasmatales din clasa bacteriilor și a fost creat genul Mycoplasma.

Micoplasmele se caracterizează printr-un accentuat pleomorfism. Fiind lipsite de perete celular ele se aseamănă cu protoplaștii bacterieni dar spre deosebire de aceștia au o mai mare rezistență la variațiile de presiune osmotică. Această rezistență se pare că poate fi atribuită sterolilor din membrana citoplasmatică, micoplasmele fiind singurele procariote care conțin steroli. Lipsa peretelui celular și elasticitatea membranei citoplasmatice sînt cauzele accentuatului lor pleomorfism. Astfel chiar în aceiași cultură, specia Mycoplasma gallisepticum se poate prezenta în forme sferice, hexagonale, helicoidale, filamentoase sau filamentoase ramificate, cu dimensiuni variind de la 90 mμ pînă la 1 sau 1,2 μ . Existența formelor filamentoase explică și numele de micoplasme dat acestor organisme.

Formele cocoide, cu diametrul de 90-300mμ ,străbat filtrele impermeabile pentru bacterii asemănîndu-se din acest punct de vedere cu virusurile. Totuși aceste forme cocoide

conţin ambii acizi nucleici şi reprezintă cele mai mici unităţi capabile de dezvoltare şi reproducere independentă, pe medii de cultură artificiale. Ele poartă denumirea de unităţi minime de reproducere sau corpi elementari.

Cu toate că molecula lor de ADN este lungă de numai 260 μ ea conţine suficiente informaţii genetice pentru codificarea tuturor proteinelor necesare unei existenţe independente. Citoplasma lor conţine ribozomi izolaţi sau grupaţi în formaţiuni analoage funcţional polisomilor.

Cultivarea micoplasmelor se face pe medii adiţionate cu ser sangvin sau lichid ascitic, lichide care le asigură acizii graşi nesaturaţi şi sterolii necesari sintezei membranei citoplasmatice, precum şi o serie de factori de creştere Proteinele serice sînt necesare nu atît pentru sintezele proprii cît mai ales ca agenţi de complexare şi de detoxificare a acizilor graşi nesaturaţi necesari dezvoltării micoplasmelor dar care în cantităţi mari devin toxici.

Pe medii de cultură solide micoplasmele formează colonii mici, cu diametrul de 0,5 mm, prezentînd centrul dens, de culoare închisă şi zonele periferice clare, cu o structură granulară fină.

Dezvoltarea lor nu este oprită de penicilină, cicloserină sau alte antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular. Mediile cu astfel de antibiotice se folosesc pentru izolarea micoplasmelor.

Micoplasmele prezintă un ciclu de reproducere caracteristic. Acesta începe de la unitatea minimă de reproducere, care după un număr succesiv de replicări ale ADN, se măreşte devenind sferică-globuloasă sau filamentoasă. Fiecare unitate nucleară apoi se înconjoară cu citoplasmă şi membrană proprie, astfel încît în interiorul formei globuloase sau filamentoase apar mai multe zone granulare care se pot separa, prin diviziune binară, de masa de creştere, formînd noi unităţi minime de reproducere apte să reiniţieze ciclul. (Fig.nr.78).

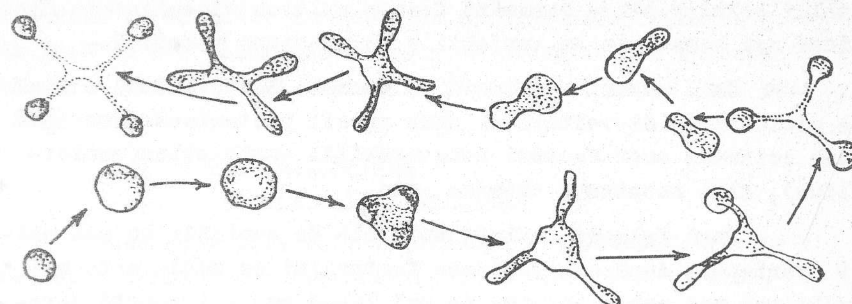


Fig.nr.78.Ciclul de multiplicare la micoplasme.

După Klineberger Nobel şi Dienes formele filamentoase sînt caracteristice numai pentru specia *Mycoplasma mycoides*.

Taxonomia mycoplasmelor. Fac parte din clasa *Mollecutes*, ordinul *Mycoplasmatales*, cu două familii: *Mycoplasmataceae* (genul *Mycoplasma*) şi *Acholeplasmataceae* (genul *Acholeplasma*). Speciile mai importante sînt:

- *Mycoplasma pneumoniae* - agentul etiologic al pneumoniei atipice, primare, umane;
- *Mycoplasma mycoides* - agentul pleuropneumoniei bovinelor;
- *Mycoplasma agalactiae* şi
- *Mycoplasma gallisepticum*, patogene pentru animale;
- *Mycoplasma laidlawii* - saprofită.

9.1. Formele "L"

In 1935, E.Klineberger Nobel descoperă că unele eubacterii pot da naştere spontan la forme cu caractere structurale şi de dezvoltare asemănătoare micoplasmelor. Ele au fost descrise iniţial la *Streptobacillus moniliformis* şi numite forme L ca omagiu adus Institutului Lister din Londra unde s-a făcut descoperirea. Ulterior astfel de forme au fost descrise şi la alte specii aparţinînd genurilor: *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Shigella*, *Bacillus*, *Clostridium* ş.a.

Prin dimensiuni, filtrabilitate şi prin lipsa pere-

telui celular ele se aseamănă foarte mult cu micoplasmele. Sînt însă mai sensibile la variaţiile de presiune osmotică.

Unii autori consideră că formele L reprezintă o fază a ciclului de dezvoltare al unor specii bacteriene care apar sub acţiunea unor factori nefavorabili: antibiotice(penicilina), alte substanţe chimice, etc.

După <u>Tulasne</u>, există un ciclu de evoluţie cu mai mult variante, după cum acţiunea factorului de mediu este mai mult sau mai puţin intens, de mai lungă sau mai scurtă durată.(Fig.nr.79).

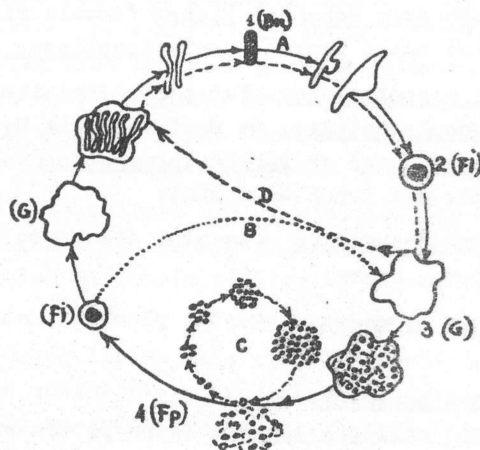


Fig.nr.79.Ciclurile formelor L.
A.Ciclul L complet
B.Ciclul intern indirect
C.Ciclul intern direct
D.Ciclul incomplet.
Bn.bacterie normală;Fi:formă intermediară;
G:formă gigant;Fp:formă pitică.

Formele bacteriene L au potenţial capacitatea de a reveni la tipul celular normal.

Dacă formele bacteriene L pot să apară spontan în natură din eubacterii, sub acţiunea unor factori de mediu sau în urma unor mutaţii care afectează capacitatea de sinteză a peretelui celular, este de prepupus că după un mecanism asemănător ar fi putut să apară şi micoplasmele. Pînă în prezent însă nu s-a putut face dovada că micoplasmele au capacitatea de a reface tipul bacterian normal, iar acest test pare să fie crucial.

10.<u>CYANOBACTERIILE</u>
(<u>Algele albastre-verzi</u>)

Cyanobacteriile sînt organisme procariote fototrofe care, spre deosebire de bacteriile fototrofe propriu zise, folosesc apa ca donator de electroni şi în prezenţa luminii produc oxigen. Mecanismul lor fotosintetic este identic cu cel de la algele eucariote.

Celulele prezintă un perete celular rigid, multistratificat, asemănător bacteriilor Gram negative. Stratul intern este de natură mureinică. Peretele celular poate fi acoperit la exterior de o teacă gelatinoasă sau fibroasă.

Cele mai multe cyanobacterii sînt mobile într-un anumit stadiu de dezvoltare. Mobilitatea este întotdeauna de tip glisant, dependentă de suprafaţa de contact. Din acest punct de vedere se aseamănă cu bacteriile filamentoase, glisante, de tip <u>Beggiatoa</u>.

Citoplasma este traversată de un sistem dezvoltat de lamele fotosintetizante, dispuse în perechi(<u>tylakoizi</u>), care poartă pe suprafaţa lor externă granule caracteristice (<u>ficobilizomi</u>)formate din agregate de pigmenţi ficobiliproteici.

Pigmenţii fotosintetizanţi sînt reprezentaţi numai de clorofila "a" şi de ficobiliproteine (<u>alloficocyanina</u>, <u>ficocyanina</u> şi uneori <u>ficoeritrina</u>). Celulele au spectrul de absorbţie cu un pic la 680 mμ corespunzător clorofilei "a" şi o bandă lată de absorbţie, cu unul sau mai multe picuri între 560 şi 650 mμ ,corespunzătoare ficobiliproteinelor.

In citoplasmă se observă vacuole cu gaz cu rol de flotaţie.

Unele cyanobacterii sînt unicelulare, altele sînt

filamentoase formate din lanţuri de celule.(Fig.nr.80).

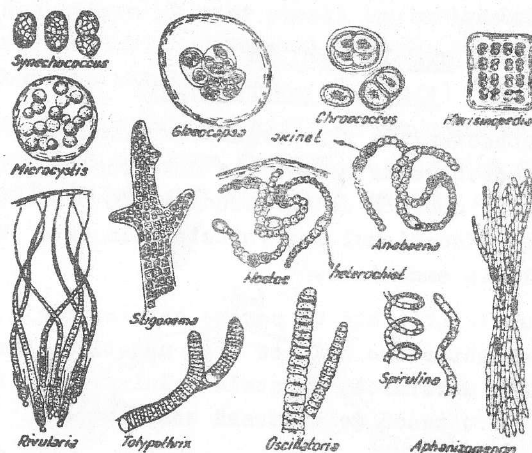


Fig.nr.80.Cyanobacterii.

Reproducerea formelor unicelulare se face prin diviziune binară, prin diviziune multiplă sau prin eliberarea în serie a unor celule apicale(gonidii) de către un individ sesil.

Formele filamentoase cresc prin diviziuni celulare repetate, intercalate şi se reproduc separat prin eliberarea terminală a unor lanţuri scurte de celule mobile numite hormogonii (Fig.nr.81). Unele forme filamentoase pot produce celule specializate cunoscute sub numele de akineţi sau spori. Aceştia au diametrul transversal mai mare decît al celulelor filamentului, conţin mai mult ADN şi reprezintă o formă de rezistenţă, de aşteptare(resting spores). Din germinarea lor va rezulta un nou filament.

Akineţii nu sînt celule de reproducere. Ei se formează în perioade de uscăciune sau de scădere a temperaturii mediului. Se disting de celulele învecinate prin prezenţa unor granulaţii polare, refringente şi printr-un perete celular mai gros.

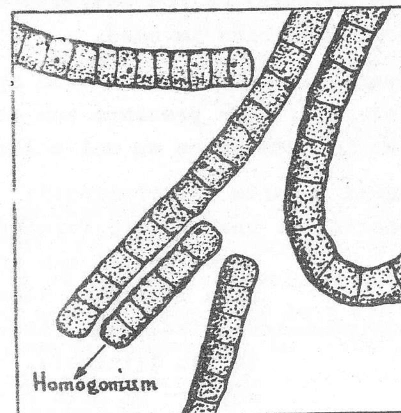


Fig.nr.81.Hormogonium la Oscilatoria sp.

Unele cyanobacterii şianume cele fixatoare de azot molecular, formează heterochişti. Aceştia se formează dintr-o celulă vegetativă, de obicei cîte unul pentru fiecare filamente Au formă ovală sau rotundă şi sînt consideraţi ca celule specializate fiziologic pentru fixarea azotului molecular.

Intre heterochişti şi celulele vegetative învecinate se stabilesc strînse interrelaţii în sensul că celulele le furnizează produşii de fotosinteză iar heterochiştii aprovizionează celulele vegetative cu produşii finali şi fixării azotului molecular.

Cyanobacteriile sînt strict fotoautotrofe şi nu se pot dezvolta la întuneric, în prezenţa substanţelor organice. Nu necesită vitamine sau factori speciali de creştere. Ca sursă de azot folosesc azotaţii, sărurile de amoniu şi azotul molecular (unele specii).

Cyanobacteriile sînt larg răspîndite în natură.Le întîlnim în sol, ape dulci, mări, oceane. In general tolerează mult mai bine decît algele eucariote condiţiile extreme de mediu. Sînt microorganisme dominante în lacurile saline şi solurile deşertice aride pe care, în condiţii de puternică luminozitate, formează cruste superficiale rămînînd dormante uneori mai mulţi ani şi dezvoltîndu-se apoi intens în scurtele

perioade de ploi de iarnă sau primăvară. In apele marine, sau în lacurile bogate în azotați, se pot dezvolta foarte intens producînd fenomenul de înflorire în masă.

Taxonomia cyanobacteriilor se bazează aproape exclusiv pe cabacterele morfologice. După prezența sau absența hormogoniilor sînt împărțite în două grupe cu mai multe ordine.

I. Cyanobacterii lipsite de hormogonii:

1. Ord. Chroococcales: unicelulare, formînd uneori pachete de celule sau colonii. Se divid prin diviziune directă.

3. Ord. Chamaesiphonales: unicelulare filamentoase, epifite sau litotrofe. Diviziune prin septare și prin formarea de gonidii la capătul filamentului.
Genuri: Chamaesiphon și Dermocarpa

3. Ord. Pleurocapsales: filamentoase, diviziune prin septare.
Gen: Pleurocapsa.

II. Cyanobacterii cu hormogonii:

4. Ord. Nostocales: filamente neramificate sau fals ramificate. Heterochiștii prezenți, adesea.

a) Fam. Oscillatoriaceae: filamente neramificate, fără heterochiști.
Genuri: Oscillatoria și Spirulina

b) Fam. Nostocaceae: filamente neramificate, heterochiști prezenți. Akineți prezenți.
Genuri: Nostoc și Anabana.

c) Fam. Rivulariaceae: filamente neramificate sau fals ramificate. Heterochiștii de regulă la baza filamentului. Akineții prezenți la unele specii.
Genuri: Rivularia și Calothrix.

d) Fam. Scytonemataceae: filamente fals ramificate. Heterochiștii se găsesc la punctul aparent de ramificare.
Genuri: Tolypothrix și Scytonema.

5. Ord. Stigonematales, Filamente seriene și neaeriene diferențiate, adesea ramificate. Prezintă heterochiști și rar akineți.
Genuri: Mastigocladus și Stigonema.

Cercetări paleontologice au arătat că cyanobacteriile sînt organisme primitive care au apărut în urmă cu 1-2 miliarde de ani. Probabil că ele au fost primele organisme de pe pămînt capabile să producă oxigen și deci ele ar fi fost răspunzătoare de producerea oxigenului în atmosfera arhaică, creînd condițiile reclamate de evoluția eucariotelor dependente de respirația mitocondrială.

PARTEA II-a. MICROORGANISMELE ACELULARE.

11. VIRUSURILE

In primele etape de dezvoltare ale microbiologiei, noțiunea de virus era folosită pentru a desemna un agent infecțios capabil să producă o boală. Abia spre sfîrșitul sec. XIX conceptul de virus începe să se contureze cu mai multă precizie.

In 1892 botanistul rus Dimitrie Ivanovski descoperă că boala mozaicul tutunului era provocată de un agent infecțios care nu aparținea la nici una din categoriile de microorganisme sau toxine, atunci cunoscute. Acest agent era capabil să transmită infecția în serie la plantele sănătoase, prin inocularea extractului frunzelor de tutun bolnave de mozaic, filtrat în prealabil prin filtre bacteriologice, dar nu putea fi observat la microscop și nici cultivat pe medii de cultură artificiale. Ivanovski credea că mozaicul tutunului este produs de o bacterie foarte mică.

Primele indicații asupra faptului că virusurile sînt agenți infecțioși și cu o natură total diferită de a microorganismelor celulare au fost aduse de cercetările lui Martinus Beijerinck (1898) care constată că virusul mozaicului tutunului poate fi precipitat cu alcool dintr-o suspensie, fără să-și piardă infecțiozitatea și că este capabil să difuzeze

.n gel de agar, proprietăţi ce nu caracterizează organismele
rii. M.Beijerinck nu considera virusul ca organism viu ci ca
ın "principiu infecţios fluid".

Intuiţia lui Beijerinck avea să fie confirmată cu aproa-
e 40 ani mai tîrziu cînd Wandell M.Stanley, în 1935, demons-
rează că virusul mozaicului tutunului cristalizează şi că
ceste cristale sînt de natură proteică. In felul acesta s-a
emonstrat că virusurile sînt proteine pentru ca apoi să se
onstate că de fapt ele reprezintă un complex molecular con-
tituit din două tipuri diferite de macromolecule: una protei-
ă şi alta nucleică.

In primele 2-3 decenii ale secolului XX s-a descoperit
ă mai multe boli ale plantelor, animalelor şi omului sînt
roduse de astfel de agenţi infecţioşi, numiţi "virusuri fil-
rabile", denumire astăzi părăsită.

F.W.Twort (1915) şi F.d'Herelle (1917) descoperă inde-
endent că şi bacteriile sînt infectate şi distruse de virusuri
imilare virusurikor plantelor şi animalelor şi care au fost
enumite bacteriofagi.

In această epocă virusurile erau caracterizate prin
iltrabilitate, dimensiuni submicroscopice, infecţiozitate şi
arazitism strict intracelular.

In prezent se consideră că virusurile reprezintă un
rup sau o categorie specifică de entităţi infecţioase care
tructural şi funcţional sînt fundamental diferite de toate
icroorganismele cunoscute.

După Salvador Luria virusurile sînt entităţi submi-
roscopice care au proprietatea de a pătrunde în celulele vii
le unui organism gazdă şi de a se reproduce numai în interio-
ıl acestor celule, pentru care au o afinitate specială.

11.1.Caracterele generale ale virusurilor

Virologia a făcut progrese considerabile iar virusu-
.le au putut fi studiate şi caracterizate după ce Enders, în
949, a demonstrat că virusurile pot fi cultivate pe culturi
celule.

Ansamblul cercetărilor au arătat că un virus,în ciclul său vital, trece alternativ prin două faze: una extracelulară cînd virusul există sub formă inertă, de particulă infecţioasă sau virion şi alta intracelulară, în care virusul poate fi evidenţiat doar prin replicarea acidului său nucleic.

După Lwoff virionul se caracterizează prin:

a)Conţine un singur tip de acid nucleic, fie ADN fie ARN dar niciodată ambii.

b)Virionul reprezintă o structură definită. Acidul nucleic care reprezintă genomul său este protejat de o capsidă de natură proteică. La unele virusuri capsida este înfăşurată într-un manşon extern numit -peplos.

c)Este incapabil să crească sau să se dividă.Virionul se reproduce plecînd exclusiv de la materialul său genetic (acidul nucleic).

d)In genomul său nu conţine informaţia pentru sinteza metaboliţilor esenţiali sau pentru formarea compuşilor macroergici necesari acestor sinteze. Virionul perturbă metabolismul normal al celulei gazdă, reorientîndu-i sistemele enzimatice spre sinteza propriilor săi constituienţi. Pentru sinteza constituienţilor lor proteici virusurile utilizează ribozomii şi acizii ribonucleici transportori ai celulei gazdă. Virusurile manifestă un parazitism absolut.

11.2.Morfologia şi dimensiunile virusurilor

Morfologia virusurilor a putu fi studiată şi cunoscută graţie microscopului electronic. Forma virusurilor poate fi:

-ovoidă-sferică la virusurile animalelor şi omului sau la unele virusuri ale plantelor;

-poliedrică-paralelipipedică la virusurile animalelor;

-cilindric-alungită, filamentoasă-la virusurile plantelor şi ale insectelor;

-corpusculară, de spermatozoid(cireaşă cu coadă) sau filamentoasă la bacteriofagi.(Fig.nr.82).

Dimensiunile virusurilor au putut fi determinate prin ultrafiltrare şi ultracentrifugare dar cele mai exacte deter-

minări s-au realizat tot cu ajutorul microscopului electronic.

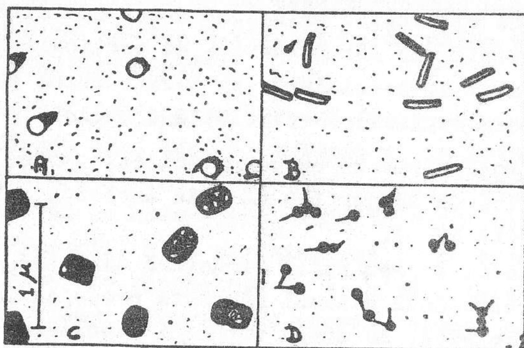


Fig.nr.82.Reprezentarea schematică a imaginilor electronice la cîteva virusuri. A:virusul gripal; B:virusul mozaicului tutunului;C:virusul vaccinal;D:bacteriofagul.

Dimensiunile lor variază de la 80-100 Å pînă la 2500-3000 Å ocupînd din acest punct de vedere o poziție intermediară între moleculele organice mari și bacteriile mici din grupul ricketsii-chlamidii.Dintre cele mai mari virusuri citām:virusul vaccină-variolă și virusul mozaicului tutunului,iar dintre cele mai mici:virusul poliomielitei și virusul Coxsakie.

11.3. Structura virusurilor

După Lwoff, Anderson și Jacob (1959) particula virală infecțioasă completă, sau virionul, reprezintă un sistem complex și organizat, în care intră două elemente componente esențiale: una genetică-ADN sau ARN- purtătoarea informației necesare pentru reproducerea entității și a doua, lipsită de proprietăți genetice, de natură proteică, numită capsidă,absolut necesară pentru a exprima natura virală a sistemului. Aceste două componente, care împreună formează nucleocapsida virionului, se găsesc în relații spațiale definite și constante una față de alta, ceea ce presupune că virionul fiecărui virus prezintă o arhitectură simetrică. La unele virusuri nucleocapsida este acoperită de un manșon extern numit peplos.

Acidul nucleic viral. Cele mai multe virusuri conțin o singură moleculă de ADN dublucatenar sau de ARN monocatenar. In ultima vreme însă au fost descrise virusuri care con-

țin o moleculă monocatenară de ADN(bacteriofagii fd, F 174), sau o moleculă dublă catenară de ARN(unele reovirusuri sau unele virusuri ale plantelor).

Lungimea moleculei de acid nucleic este constantă pentru un virus dat. Ea variază de la cîteva mii de nucleotide (sau perechi de nucleotide) pînă la 250.000, la unele virusuri. Dacă ținem seamă de faptul că circa 1000 nucleotide (sau perechi) reprezintă aproximativ o genă, înseamnă că genomul la cele mai mici virusuri conține mai puțin de 10 gene, în timp ce la virusurile cele mai mari conține cîteva sute.

ADN, la virusurile animalelor și la unii bacteriofagi, este circular în timp ce la alte virusuri cu ADN precum și la toate virusurile cu ARN acidul nucleic este linear. In unele cazuri, de exemplu la bacteriofagul λ ,ADN virionului este linear dar devine circular imediat după ce pătrunde în celula gazdă.

Capsida virală, reprezintă învelișul protector al materialului genetic. Este constituită, în forma cea mai simplă, dintr-un singur strat de molecule proteice identice, dispuse regulat, sau din două ori mai multe straturi concentrice,fiecare fiind constituit dintr-un alt tip de proteină.

Unitatea de bază a structurii capsidei este capsomera, formată dintr-un singur lanț polipeptidic(unitate structurală), sau din mai multe lanțuri polipeptidice identice sau diferite.

Capsomerele se grupează în mod ordonat și simetric. După tipul de simetrie capsidele virale pot fi de trei feluri: cubice-icozaedrice, helicale sau binare-mixte.

11.3.1.Virusurile cu capsidă cubică-icozaedrică

Microscopia electronică a demonstrat că virusurile descrise ca sferice au, în realitate, un contur hexagonal datorită capsidei lor poliedrice. O astfel de capsidă poliedrică prezintă 20 fețe triunghiulare-echilaterale,formînd un icozaedru regulat, cu un diametru de 200-1400 Å și cu trei axe de simetrie(simetrie cubică). Acest tip de capsidă îl

întîlnim la adenovirusuri, poliovirusuri, virusul herpetic sau la virusurile unor insecte(Tipula iridescent).

La adenovirusuri, de exemplu, la care virionul are un diametru mediu de 750 Å, capsida este constituită din 252 capsomere, din care 240 acoperă muchiile şi feţele icozaedrului şi sînt de forma unor prisme hexagonale, iar 12 în formă de prizme pentagonale, sînt situate în vîrfurile icozaedrului. (Fig.nr.83). Aceste două tipuri de capsomere corespund fiecăre unei proteine speciale. Deasupra celor 12 capsomere pentagonale din vîrfurile icozaedrului se găsesc 12 molecule proteice în formă de "limbă de clopot" care corespund unei a treia proteine specifice.

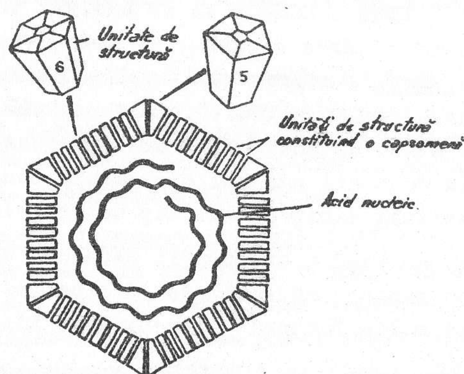


Fig.nr.83.Reprezentarea schematică a unui virus cu capsidă cubică-icosaedrică.

O astfel de capsidă icozaedrică întîlnim la un număr mare de virusuri dar ceea ce variază este diametrul virionilor şi numărul capsomerelor. De exemplu, la picornavirusuri care au diametrul virionului de 280 Å capsida e constituită din 32 capsomere, iar la Tipula iridescent cu diametrul virionului de 1400 Å capsida e formată din 812 capsomere.

La toate aceste virusuri, acidul nucleic în interiorul capsidei este înfăşurat sub forma unui ghem central.

11.3.2.Virusurile cu capsidă helicală

Din această categorie fac parte virusul mozaicului tutunului (VMT), mixovirusurile, proxvirusurile. Cel mai bine studiat este VMT. La acesta virionul are forma unei baghete cilindrice lungă de 3000 Å şi cu diametru de 170 Å .Capsomerele sînt dispuse helical. Fiecare tur de spiră este constituit din 16 capsomere şi 1/3 ceea ce face ca în turul de spiră următor să existe un decalaj de 1/3 de capsomeră. Acidul nucleic, în acest caz ARN, este inserat între capsomerele dispuse spiralat. Intreg ansamblul constituie o nucleocapsidă helicală. (Fig.nr.84).

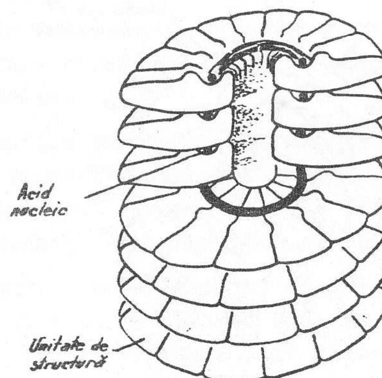


Fig.nr.84.Reprezentarea schematică a unui virus cu nucleocapsidă helicală.

Capsida virionului VMT este formată din 2130 capsomere elipsoidale, identice. Fiecare capsomeră e constituită dintr-un lanţ polipeptidic format din 158 acizi aminici cu o secvenţionalizare determinată şi bine cunoscută.

Mixovirusurile şi poxvirusurile au o structură mai complicată deoarece nucleocapsida lor helicală este acoperită la exterior de un manşon extern sau peplos care le dă formă obişnuit sferică.

La virusul gripal (mixovirus) nucleocapsida are o structură helicală cu diametrul de 90 Å. Peplosul, format din elemente ale membranei nucleare sau citoplasmatice din celula gazdă, este de natură lipoproteică. Pe suprafaţa sa se găsesc numeroase spicule (prelungiri filamentoase)reprezentînd hemaglutininele cu rol în fixarea virionilor pe celulele sensibile, iar între spicule este localizată enzima neuroaminidaza, cu rol în pătrunderea şi eliminarea virionilor din celulă.(Fig.nr.85).

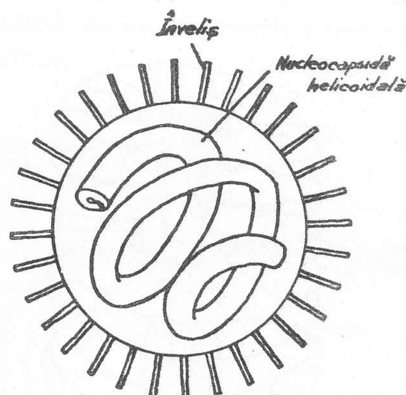


Fig.nr.85.Reprezentarea schematică a unui virus cu peplos.

11.3.3.<u>Virusurile cu capsidă binară</u>

In această categorie intră bacteriofagii specifici pentru <u>Escherichia coli</u> (bacteriofagii T). In structura acestora se distinge un cap poliedric care corespunde unei capside cu simetrie cubică şi o coadă constituită dintr-o teacă proteică cu simetrie helicală.

11.4.<u>Multiplicarea virusurilor</u>

Multiplicarea virusurilor se realizează în cinci faze:

a)Adsorbţia şi penetraţia în celula gazdă.

b)Sinteza enzimelor necesare replicării acidului nucleic viral.

c)Sinteza constituienţilor virali

d)Asamblarea constituienţilor virali în virioni maturi

e)Eliminarea virionilor maturi din celula gazdă.

Procesul de penetracţie a virionilor în celula gazdă este diferit la bacteriofagi,virusurile plantelor şi animalelor.

Bacteriofagii şi virusurile plantelor trebuie să pătrundă prin peretele celular al gazdei în timp ce virusurile animalelor se pot adsorbi direct pe membrana citoplasmatică.

Penetraţia bacteriofagilor prin peretele celular bacterian constă în injectarea, în citoplasmă, a acidului nucleic viral,proteinele capsidale rămînînd adsorbite la suprafaţa peretelui celular.

Virusurile plantelor pătrund în celulă prin leziunile mecanice ale plantelor sau sînt introduse prin înţepăturile insectelor vectoare, deoarece aceste virusuri nu dispun de mecanisme de străbatere a peretelui celular.

Virusurile animalelor se adsorb pe suprafaţa membranelor citoplasmatice şi pătrund apoi în celule prin fagocitoză sau pinocitoză. Peplosul unor virusuri facilitează adsorbţia virionilor şi pătrunderea lor prin membrana citoplasmatică a celulei gazdă.

Dacă în cazul bacteriofagilor în celula gazdă pătrunde numai acidul nucleic, în cazul virusurilor plantelor şi animalelor în celulă pătrunde întreaga nucleocapsidă, ceea ce presupune o decapsidare a virionilor prin intervenţia unei enzime proteolitice şi eliberarea acidului nucleic viral.

Acidul nucleic viral, în celula gazdă, iniţiază două procese distincte: sinteza proteinelor virale specifice şi replicarea acidului nucleic viral.

Dacă acidul nucleic viral este ARN el îndeplineşte direct funcţia de ARN mesager. In cazul cînd acidul nucleic viral este ADN atunci are loc mai întîi transcrierea infor-

maţiei genetice de ADN la ARN mesager, prin intervenţia ARN-polimerazei ADN dependentă. In ambele cazuri traducerea informaţiei genetice virale se realizează la nivelul ribozomilor celulei gazdă, unde se sintetizează enzimele necesare replicării virale ca şi proteinele capsidale.

Acidul nucleic viral serveşte ca matriţă pentru replicarea sa prin sinteza catenelor complimentare, datorită polimerazelor specifice. Mecanismul replicării diferă după cum este vorba de ADN sau ARN, dublu sau monocatenar,circular sau liniar.

Procesele de sinteză a proteinelor şi de replicare a acidului nucleic, duc la acumularea în celula gazdă a numeroase molecule de acid nucleic viral şi de proteine capsidale.Acestea se asamblează spontan formînd nucleocapsidele.

Ultimul stadiu al multiplicării virale îl constituie eliberarea virionilor maturi din celulele gazdă. La bacterii acest fenomen este însoţit de liza celulei produsă de o enzimă virală. La celulele animale eliberarea se poate face prin extrucţie(clasmatoză)sau prin liză.

11.5.Clasificarea virusurilor

După Lwoff şi colab.(1962) virusurile se clasifică în grupe după proprietăţile virionilor, luîndu-se în consideraţie tipul de acid nucleic, alcătuirea capsidei,prezenţa sau absenţa peplosului şi mărimea capsidei. Subdiviziunile grupelor de virusuri se fac după alte proprietăţi cum ar fi numărul catenelor acidului nucleic, locul sintezei virale în celula gazdă, interacţiunea virus-celulă gazdă.

Acest sistem deşi nu reprezintă o clasificare naturală sau filogenetică, deoarece nu constituie o expresie a relaţiilor evolutive dintre virusuri, prezintă totuşi avantajul că grupează virusurile după un set de proprietăţi chimice şi structurale constante şi care pot fi determinate cu precizie. Totuşi, datorită metodelor diferite de studiu a virusurilor, este larg utilizată şi clasificarea virusurilor în: virusuri bacteriene sau bacteriofagi, virusurile plantelor şi virusurile animalelor.

Tabel nr.28
CLASIFICAREA VIRUSURILOR

Acidul nucleic	Simetria capsidei	Prezenţa sau absenţa peplosului	Dimensiunile capsidei în Å.	Numărul capsomerelor	Proprietăţi speciale	Exemple: Virusuri bacteriene	Exemple: Virusuri animale	Exemple: Virusurile plantelor
ARN	Helicală	Absent	175 x 3000					Virusul mozaicului tutunului
		Prezent	90 180				Myxovirus Paramyxovirusuri.	
	Cubică-icozaedrică	Absent	200 - 250 280	32		Fagul f2.	Picornavirusuri	Virusul Bushy
			700	92	ARN dublu catenar.		Reovirusuri	
ADN	Helicală	Absent	50 x 8000		ADN monocatenar	Fagul fd.		
		Prezent	90 - 100				Poxvirusuri	
	Cubică-icozaedrică.	Absent	220	12	ADN monocatenar	Fag O x 174		
			450 - 550	72			Polyoma Papilloma Adenovirusuri	
			600 - 900 1400	252 812			Tipula Virusurile insectelor	
		Prezent		162			Herpesvirus	
	Binară	Absent	Cap:950x650 Coadă: 170x1150			Fagii T_2,T_4 T_6		

In ultimii ani s-au identificat şi virusuri specifice pentru cyanobacterii şi pentru fungi.

11.6.Bacteriofagii

Existenţa virusurilor bacteriene semnalată de Twort în 1915 a fost confirmată, în 1917, de d'Herelle care descoperă, în fecalele unui convalescent de dizenterie, un agent infecţios capabil să distrugă specific culturile de *Shigella dysenteriae*. Acest agent infecţios a primit denumirea de bacteriofag. Ulterior s-a constatat că aproape fiecare specie bacteriană poate servi drept gazdă pentru unul sau mai mulţi bacteriofagi.

Bacteriofagii prezintă proprietăţile generale ale tuturor virusurilor. Observaţi la microscopul electronic ei prezintă o morfologie variată. In general se disting:

-bacteriofagi filamentoşi: M_{13};

-bacteriofagi poliedrici: T X 174,f2,MS2;

-bacteriofagi cu morfologie complexă,formaţi dintr-un cap icozaedric şi o coadă helicală: T.

Există bacteriofagi cu ADN şi bacteriofagi cu ARN.

11.6.1.Bacteriofagii cu ADN

Cei mai bine studiaţi din această categorie sînt bacteriofagii din seria T, specifici pentru *Escherichia coli*. Seria T cuprinde 7 bacteriofagi diferiţi, notaţi de la T_1 la T_7, împărţiţi în două grupe:

-grupul T par : T_2,T_4 şi T_6;

-grupul T impar: T_1,T_3,T_5 şi T_7.

Bacteriofagii din grupul T par conţin în ADN lor hidroximetilcitozină în loc de citozină, fapt care face uşoară reperarea ADN fagic în celula bacteriană infectată.Toţi bacteriofagii seriei T posedă un ADN dublucatenar cu helixul deschis.

Bacteriofagul λ specific pentru *Escherichia coli* K_{12} conţine de asemenea un ADN cu dubluhelixul deschis dar terminat prin secvenţe monocatenare complimentare.

Alţi bacteriofagi, de dimensiuni mai mici, cum este fagul T X 174, au un ADN monocatenar circular şi o capsidă cubică-icozaedrică. De asemenea fac parte din acest grup şi bacteriofagii filamentoşi, lungi de 800 mμ şi cu diametrul transversal de 8 mμ .

11.6.1.1.Morfologia şi structura bacteriofagului T_2.

Bacteriofagul este constituit din două părţi:

-un cap sferic, cilindric sau prismatic hexagonal reprezentînd o capsidă proteică cu simetrie cubică-icozaedrică, groasă de 12,5 mμ ,care înconjoară şi protejează un filament înrulat de ADN şi

-o coadă proteică, cu o simetrie helicală.(Fig.nr.86).

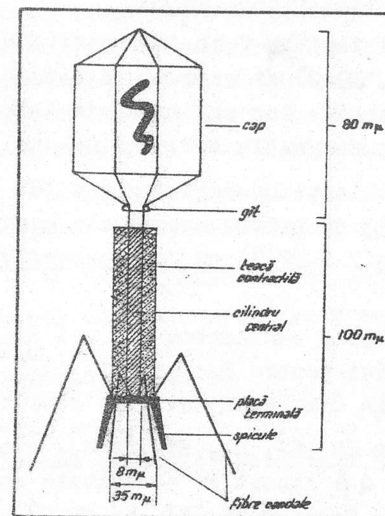


Fig.nr.86.Bacteriofagul T_2.

Capul bacteriofagului T_2 este prismatic hexagonal, de 80 mμ lungime. ADN este reprezentat de o moleculă de aproximativ 60 μ ,cu capetele deschise, conţinînd circa 200.000 nucleotide şi avînd o greutate moleculară de $120x10^6$ daltoni.

Coada fagului T_2, lungă de 100 mμ ,prinsă de cap printr-un col(gît), este formată dintr-un cilindru central rigid şi gol, cu diametrul de 8 mμ , care comunică cu capul şi o teacă proteică helicală, contractilă, cu diametrul de 35 mμ , Extremitatea distală a cozii se termină cu o placă enzimatică(placă terminală) pe care se fixează 6 filamente sau fibre caudale reprezentînd organele de fixare a bacteriofagilor pe bacteria sensibilă.

Simetria bacteriofagului T_2 este dublă sau binară: cubică pentru cap şi helicală pentru coadă.

Dacă virionii fagici sînt supuşi şocurilor osmotice, capii fagici eliberează conţinutul lor în ADN, devenind fagi fantomă.

11.6.2.Bacteriofagii cu ARN

Aceşti bacteriofagi au fost descoperiţi mai recent (Loeb, Loeb şi Zinder, 1960) şi reprezintă cele mai mici virusuri cunoscute, Capsida lor prezintă simetrie cubică-icozaedrică, iar genomul, respectiv ARN,conţine numai 3 gene.

Au fost identificaţi bacteriofagi cu ARN specifici pentru Escherichia coli şi pentru specii ale genurilor Pseudomonas aeruginosa(7 S,PP 7) şi Caulobacter crescentus (ØCb5).

După proprietăţile serologice din cei peste 40 bacteriofagi cu ARN specifici pentru Escherichia coli, au fost clasaţi patru grupe din care două mai bine studiate:

-grupa fagilor MS_2,f2, R_{17},FN_5,fr,M_{12} etc.şi

grupa fagului Qβ lipsit de comunitate antigenică cu grupa precedentă-grupa fagilor GA, EI, Kj,SS,SB,etc.

-grupe fagilor SP, FI.

Virionii au diametrul de 20-27 mμ .Capsida(lipsită de coadă) este cubică-icozaedrică, formată din 32 capsomere (12 pentamere şi 20 hexamere) şi 180 subunităţi structurale (12 x 5 + 20 x 6). Subunităţile structurale sînt identice fiind constituite dintr-o singură proteină capsidală, cu greutate moleculară de 14.200 daltoni, pentru fagii R_{17} şi MS_2 şi de 15.500 daltoni pentru fagul Qβ .

Această proteină capsidală conţine 129 acizi aminici cu o secvenţionalizare cunoscută la fagii R_{17} şi f2. Ea nu conţine histidină, iar la fagul Qβ este lipsită de triptofan. Proteinele capsidale la fagii f2, MS_2 şi R_{17}, se deosebesc numai printr-un singur acid aminic.

In afară de proteinele capsidale aceşti fagi conţin o proteină de asamblare,numită proteina A,cîte o moleculă pentru fiecare virion. Proteina A are o greutate moleculară de 40.000 daltoni şi e formată din 350 acizi aminici.

ARN fagic este o moleculă monocatenară, constituită din 3300-3500 nucleotide. Are o greutate moleculară de 1,1 x 10^6daltoni şi o lungime de 1,06 μ . Această moleculă este lineară dar circa 70% dintre nucleotide sînt împerecheate între ele într-o dublă elice,formînd de-a lungul catenei o serie de bucle. Numărul de nucleotide corespunde numai la 3 gene ceea ce înseamnă că genomul viral codifică sinteza numai a 3 proteine: proteina capsidală, proteina de asamblare (proteina A) şi o enzimă, replicaza virală,necesară replicării.

ARN este legat de proteina de asamblare şi reprezintă 31% din virion, iar proteinele capsidale 69%.

11.6.3. Multiplicarea bacteriofagilor

Infecţia unei bacterii gazdă cu un bacteriofag prezintă două aspecte.(Fig.nr.87).

a)Bacteriofagul se reproduce pe seama bacteriei pe care o distruge. Aceasta este infecţia litică, iar bacteriofagii care lizează celulele bacteriene se numesc bacteriofagi virulenţi.

b)Acidul nucleic fagic, injectat în celula bacteriană, nu se replică autonom ca în primul caz ci se integrează în cromozomul bacterian, comportîndu-se ca o genă bacteriană şi replicîndu-se sincron cu cromozomul. Acest bacteriofag poartă numele de fag temperat, iar tipul de relaţie dintre virus şi celula gazdă este cunoscut sub numele de lizogenie. Bacteriile care poartă şi transmit fagul temperat la descendenţi se numesc bacterii lizogene.

Ciclul de multiplicare al bacteriofagilor virulenţi este diferit, după cum e vorba de bacteriofagi cu ADN sau cu ARN.

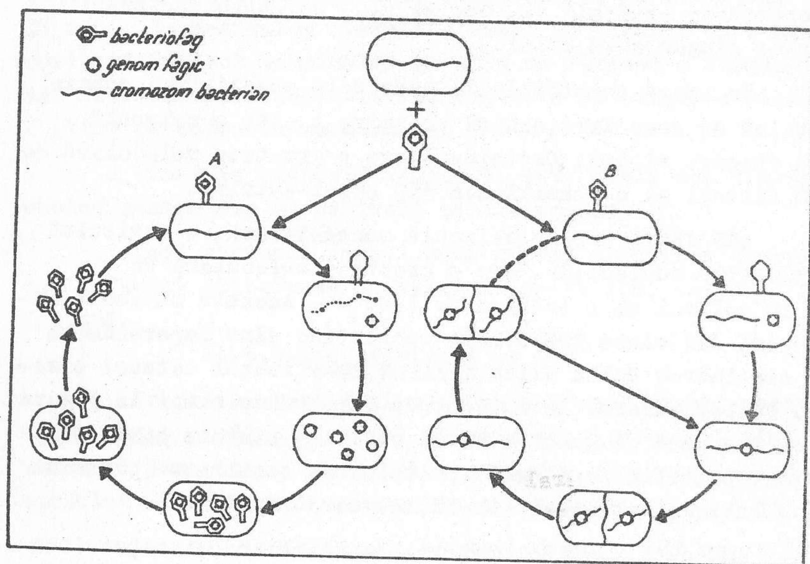


Fig.nr.87.Infecţia unei celule bacteriene cu un bacteriofag.
A.Infecţia litică. B.Infecţia lizogenă.

11.6.3.1.<u>Ciclul de multiplicare al bacteriofagilor virulenti cu ADN</u>.

Pentru exemplificare ne vom referi la multiplicarea bacteriofagului T_2 în celulele de <u>Escherichia coli</u>,urmărind cele 5 faze ale ciclului.

1.<u>Faza de adsorbţie şi penetraţie</u>.Mecanismele care intervin în cursul acestei faze sînt complexe. Se pot distinge trei etape succesive: fixarea virionului pe peretele celular,pătrunderea prin peretele celular şi injectarea, în citoplasmă, a acidului nucleic fagic.

Adsorbţia(fixarea)bacteriofagului pe bacteria gazdă este rezultatul interacţiunii dintre proteinele din coada fagului şi receptorii situaţi în peretele bacterian. Fagii nu

se fixează decît pe peretele bacterian chiar dacă acesta este lipsit de conţinutul său citoplasmatic. Ei nu se fixează pe protoplaşti(sferoplaşti) tocmai pentru că aceştia nu au perete celular.(Fig.nr.88). O celulă de <u>Escherichia coli</u> poate fixa

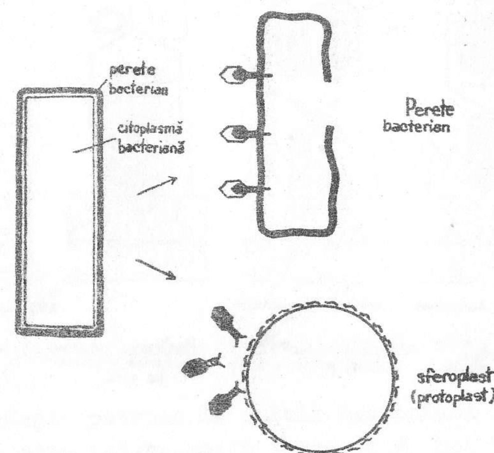


Fig.nr.88.Adsorbţia bacteriofagului numai pe peretele celular al celulei bacteriene.

între 200 şi 300 virioni T_2. Receptorii din peretele celular sînt diferiţi şi specifici pentru fiecare fag. Cei specifici fagilor T_2 şi T_6 sînt situaţi în pătura lipoproteică, iar cei specifici fagilor T_3,T_4 şi T_7 în pătura lipopolizaharidică a peretelui celular.

Fixarea virionilor se face prin intermediul fibrelor cozii fagului şi a plăcii terminale. Dacă fagii sînt dezintegraţi şi diferitele lor fragmente se pun în prezenţa bacteriilor receptive, se constată că cozile lor, sau chiar fibrele caudale izolate, se fixează pe bacterii ceea ce nu se întîmplă în cazul capilor fagilor sau a ADN.

Momentul iniţial al fixării este probabil reversibil dar fixarea devine repede ireversibilă,structura fagului modificîndu-se în contact cu bacteria.(Fig.nr.89). In acest moment

o enzimă din zona enzimatică(placa terminală) a cozii fagului devine activă și atacă legăturile glicozidice depolimerizînd mucocomplexul peretelui bacterian.

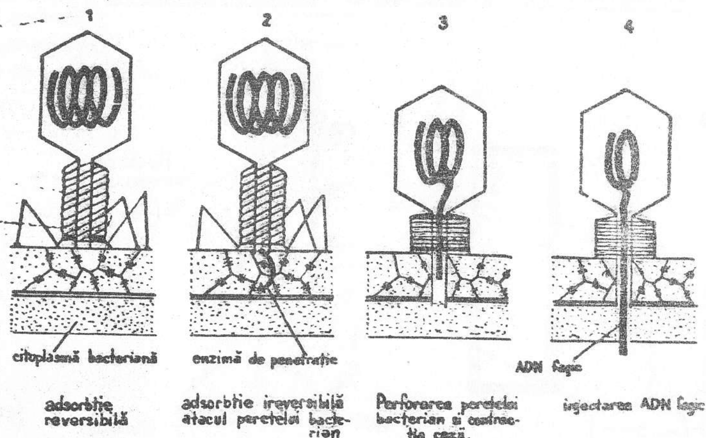


Fig.nr.89.Primele etape ale infecției fagice.

In urma intervenției enzimei de penetrație,peretele celular se dislocă local astfel că în mediu se vor întîlni elemente aparținînd peretelui celular bacterian cît și a citoplasmei subjacente. Concomitent are loc o contracție a cozii fagului.(3 fig.89). Axul tubular al acesteia se inseră în peretele bacterian, traversează zona de mai mică rezistență iar conținutul capului fagic(ADN) este injectat în celula bacteriană (4 fig.89) lăsînd la exterior o umbră, o "fantomă" constituită din capul (fără ADN) și coada fagului.

In celula bacteriană pătrunde numai ADN fagic.Acest fapt a fost dovedit experimental de Hershey și Chase, în 1952. Unui lot de fagi i s-a marcat ADN cu P^{32} iar proteinele capsidale cu S^{34}. Acești fagi sînt puși apoi în contact cu bacterii sensibile și imediat după ce începe infecția,printr-o agitare mecanică puternică, se separă bacteriile infectate și "fantomele" fagice. Se constată că întreaga cantitate de P^{32} este întîlnită în interiorul bacteriilor iar S^{34} la exte-

rior, în "fantome".(Fig.nr.90).

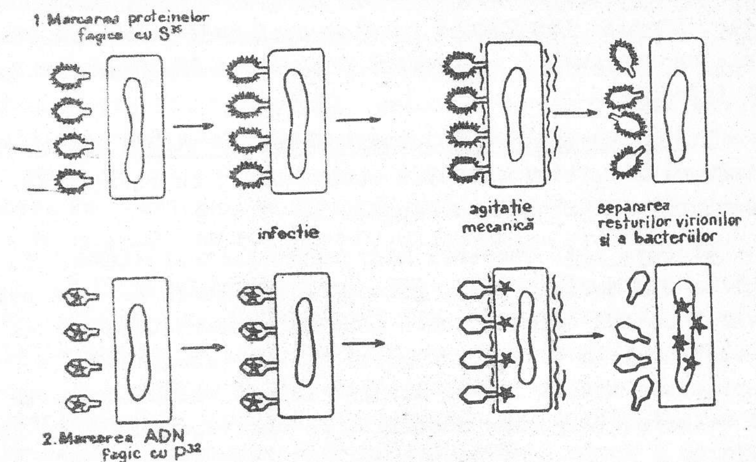


Fig.nr.90.Experiențele lui Hershey și Chase.

ADN fagic pătruns în celula bacteriană deține întreaga informație genetică necesară sintezei de noi virioni.

2.Faza de eclipsă sau de sinteză a enzimelor necesare acidului nucleic viral.

Imediat după pătrunderea ADN fagic în celulă bacteriofagul încetează de a mai exista ca o entitate independentă. Acest fenomen corespunde fazei de eclipsă cînd fagul intră în fază vegetativă.

In cursul acestei faze, în celula bacteriană are loc o dezorganizare totală a funcțiilor. Pe de o parte procesele de sinteză normale se opresc, iar pe de altă parte intră în funcțiune mecanismele care asigură sinteza elementelor fagice.

Oprirea proceselor normale de sinteză se traduce prin sistarea sintezei proteinelor paralel cu dezintegrarea cromozomului bacterian ceea ce pune capăt definitiv diviziunilor celulare.

Reorientarea funcțiilor celulare este marcată de apariția unui ARN special, un ARN mesager prin transcrierea informației de pe ADN fagic, care va codifica sinteza de proteine noi, numite "proteine precoce", cu rol de enzime(există cel

puţin 14 asemenea enzime diferite: polimeraze, kinaze, transferaze, sintetaze, dezoxiribonucleaze, etc.,)necesare replicării ADN fagic. Sinteza lor începe imediat după injectarea ADN viral în celula bacteriană şi se termină după circa 15 minute de la debutul infecţiei.

3.Faza de sinteză a constituienţilor virali.In cazul bacteriofagului T_2 virionii sînt constituiţi, în esenţă,din AD' înconjurat de proteinele capsidale.

Sinteza ADN. Prezenţa hidroximetilcitozinei(HMC) în ADN fagilor din seria T pară, permite distingerea cu uşurinţă a ADN viral de ADN celular, care conţine citozina.Cantitatea de HMC conţinută în virionul fagului T_2 este cunoscută; împărţind cantitatea totală de HMC dintr-o celulă bacteriană,prin această valoare, se obţine numărului de echivalenţi fagici din acea celulă.

ADN viral se poate pune în evidenţă, în celula bacteriană, după circa 5-7 minute de la debutul infecţiei.Numărul echivalenţilor fagici creşte apoi linear pînă la eliberarea virionilor. In acest moment celula conţine circa 200 echivalenţi fagici în ADN.(Fig.nr.91).

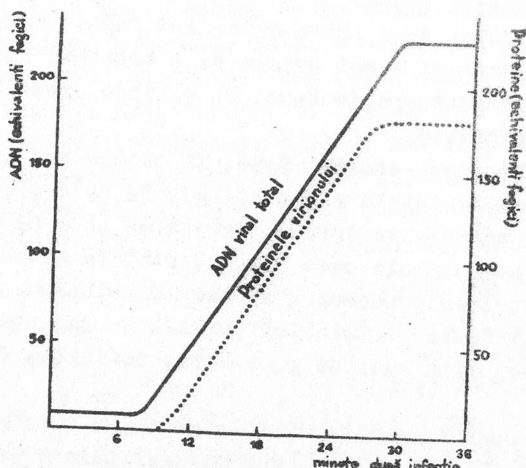


Fig.nr.91.Sinteza constituienţilor virali.

Sinteza acestui ADN este dirijată de ADN viral infectant şi se realizează pe seama resturilor cromozomului bacterian şi a elementelor nutritive din mediu. Ea necesită intervenţia unui sistem enzimatic, a unei ADN-polimeraze în special,enzimă care face parte din "proteinele precoce" de informaţie virală. Moleculele astfel sintetizate se acumulează formînd un "fond comun" care se prezintă sub aspectul unui gel de ADN foarte hidratat. Pe acest gel se fixează apoi o teacă formată din molecule de glucoză, cu rol protector împotriva nucleazelor.

Sinteza proteinelor. Printre proteinele virale codificate de ADN fagic se disting proteine de structură care vor constitui capsida şi proteine care nu vor fi încorporate în virioni. In legătură cu proteinele capsidale se pot defini echivalenţi-fagici proteici, analogi echivalenţilor fagici de ADN. Proteinele capsidale apar în celulă după circa 9 minute de la debutul infecţie (Fig.91). Numărul echivalenţilor fagici de proteină creşte apoi paralel cu cel al echivalenţilor fagici de ADN.

Aceste proteine sînt aproape exclusiv sintetizate pe seama acizilor aminici din mediu. Sinteza lor are loc la nivelul ribozomilor celulei bacteriene care, în momentul respectiv, traduc mesajul înscris în ARN mesager specific fagului.

Punctul de plecare al celor două lanţuri de sinteze, nucleică şi proteică, este ADN viral introdus prin efracţie în citoplasma bacteriană. Acest acid nucleic posedă înscris pe toată lungimea moleculei sale, modelul care, după replicări succesive, va duce la formarea fondului comun de ADN viral şi informaţia necesară sintezei proteinelor virale.

Sinteza proteinelor poate fi blocată cu ajutorul antibioticelor de tip cloramfenicol. Dacă acestea acţionează în primele minute după infecţia fagică, se blochează sinteza enzimelor necesare sintezei constituienţilor virali,în special a ADN-polimerazei. In acest caz sinteza proteinelor sau a ADN viral nu mai poate fi pusă în evidenţă. Dacă, din contra, se opreşte sinteza proteică după elaborarea proteinelor precoce, ADN-polimeraza fiind prezentă, ADN viral se va sintetiza,dar nu

şi proteinele capsidale sau proteinele tardive. Prin urmare sinteza ADN şi proteinelor sînt fenomene paralele dar ele se desfăşoară autonom, cu condiţia ca enzimele precoce să fie prezente. In cazul bacteriofagului T_2 aceste sinteze nu depind de structurile genetice ale bacteriei gazdă deoarece cromozomul ei este dezintegrat încă din primele minute ale infecţiei.

4.<u>Faza de asamblare a virionilor</u>. Deşi ADN şi proteinele capsidale specifice există în celula bacteriană după 9 minute de la debutul infecţiei, primii virioni sînt decelaţi abia după 12 minute. Numărul lor creşte apoi liniar.(Fig.nr. 92).

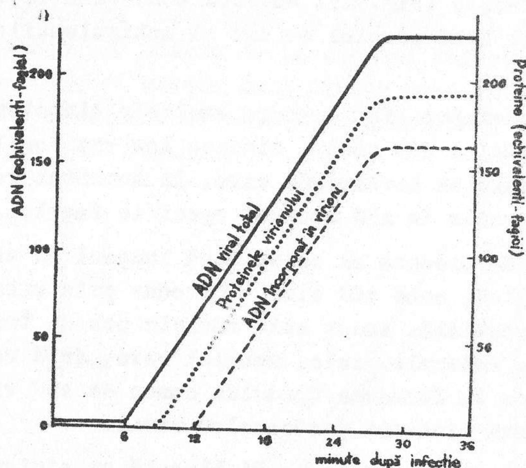


Fig.nr.92.Asamblarea virionilor.

Incepînd cu minutul al 12-lea,sintezei unei noi molecule de ADN îi corespunde încorporarea unei molecule de ADN, din fondul comun, într-un virion. Aceste sustrageri regulate, din fondul comun de ADN,explică de ce cantitatea de ADN total creşte liniar chiar dacă replicarea sa în cascadă ar trebui să ducă la o creştere exponenţială. Molecula de ADN încorporată

în virion încetează, de fapt, să se mai replice.

ADN se condensează şi ia forma unui cap de fag. In jurul acestui "nucleu" se asamblează proteinele capsidale şi după aceia se formează coada fagului.

Alături de virionii în curs de maturare şi care conţin ADN, există elemente pur proteice cu forma capului fagic dar care nu conţin(sau încă nu conţin)ADN. Asamblarea nu este deci totală deoarece întotdeauna rămîne o anumită cantitate de ADN viral şi de proteine capsidale care nu se încorporează în virionii maturi.

ADN fagi şi proteinele capsidale se asamblează în virioni respectînd reguli foarte precise, forma virionilor fiind constantă pentru un fag dat. Faptul că o structură aşa de complicată cum este aceia a virionului unui fag se asamblează cu o regularitate precisă, presupune existenţa unuia sau a mai multor mecanisme de coordonare. Acestea sînt încă puţin cunoscute dar se ştie că, în cazul fagului T_1 relativ mai bine studiat decît T_2, din acest punct de vedere, mecanismele sînt, în cea mai mare parte, genetice.

5.<u>Faza de eliberare a virionilor(liza celulară)</u>

In bacteria infectată, la sfîrşitul fazei de eclipsă, deci după 12 minute de la începutul infecţiei, există fagi maturi dar caracterul lor infecţios nu poate fi pus în evidenţă decît după distrugerea artificială a peretelui celular. Virionii apar însă în mediu după circa 25 minute. Eliberarea lor este foarte rapidă desfăşurîndu-se în cîteva secunde,(Fig.nr. 93),prin ruperea peretelui celular în urma acţiunii unei enzime, <u>endolizina</u>, de informaţie fagică.(Fig.nr.94).

Multiplicarea bacteriofagului T_2 apare deci ca rezultatul unei funcţii particulare a celulei.Deşi duce la liza celulei, această funcţie este perfect coordonată. Toate etapele multiplicării virale sînt reglate cum este de altfel orice alt proces celular normal. In cazul infecţiei virale, această nouă orientare şi coordonare a metabolismului celular este asigurată de acidul nucleic viral. Informaţia genetică a cromozomului bacterian este substituită cu o nouă informa-

ţie, aceea a ADN viral. Dar această excludere totală a acidului nucleic autohton de către acidul nucleic viral, observată în sistemul Escherichia coli-bacteriofag T_2 nu reprezintă decît un aspect al relaţiilor posibile dintre bacteriofag şi gazda sa.

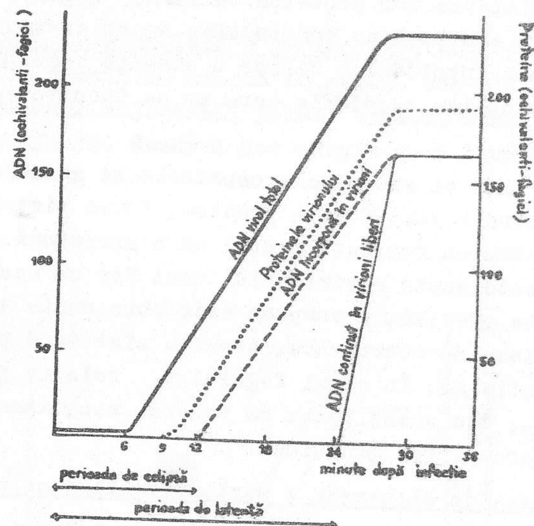


Fig.nr.93.Eliberarea virionilor

11.6.3.2.Ciclul de multiplicare al bacteriofagilor cu ARN(fagul MS_2)

Acest ciclu de multiplicare comportă aceleaşi faze ca şi ciclul precedent dar fenomenele biochimice care caracterizează fiecare fază sînt diferite.

1.Faza de adsorbţie şi penetraţie.Sensibile la bacteriofagii cu ARN sînt numai bacteriile "mascule" purtătoare a factorului de sex(F^+) şi ai pililor F.Bacteriofagii cu ARN se fixează numai la nivelul pililor F iar bacteriile la care pilii F au fost îndepărtaţi mecanic devin nereceptive la infecţia fagică. În interiorul celulei bacteriene pătrunde numai ARN viral prin canalul pilului F. Un rol important în

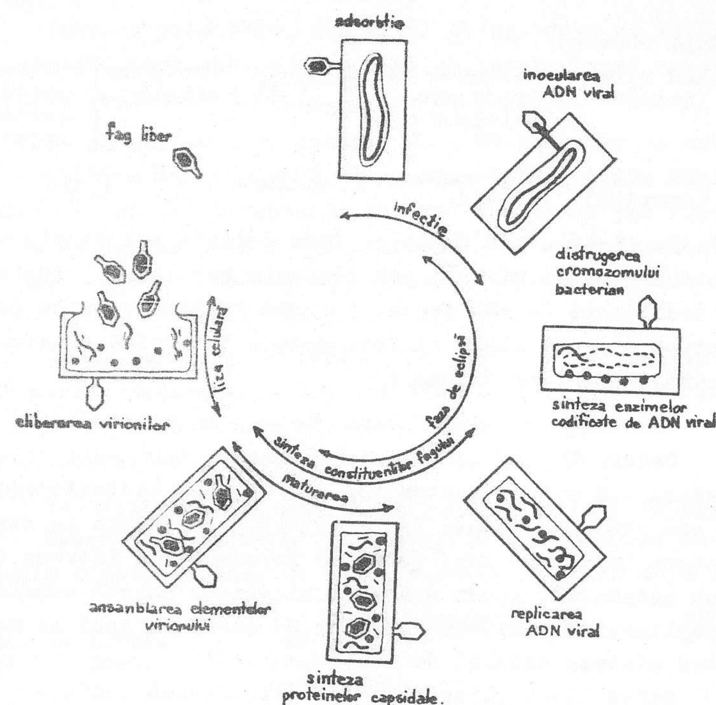


Fig.nr.94.Ciclul ontogenetic fagic.

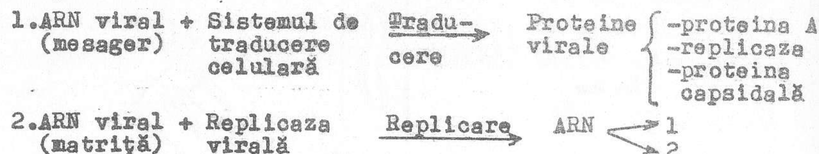
pătrunderea ARN fagic îl are proteina A şi cationii bivalenţi (Ca^{++}, Mg^{++}). Fagii mutaţi la nivelul proteinei A nu mai sînt infecţioşi.

2-3.Faza de eclipsă şi faza de sinteză a constituenţilor fagici.

Faza de eclipsă durează circa 15 minute.ARN fagic joacă rol de ARN mesager pentru sinteza celor trei proteine: replicaza, proteina A şi proteina capsidală, utilizînd pentru aceste sinteze ribozomii, ARN transportor, acizii aminici şi enzimele bacteriei gazde.

Acelaşi ARN fagic serveşte apoi drept matriţă pentru replicarea sa cu ajutorul replicazei folosind trifosfat nucleozidele celulei gazde.ARN fagic astfel sintetizat poate să îndeplinească fie funcţia de ARN mesager fie cea de matriţă pentru replicaza virală.Aceste două reacţii cuplate se reali-

zează după schema:



Replicarea ARN fagic se face independent de sinteza AF (bacteriei gazdă şi necesită prezenţa replicazei virale, e: zimă codificată de ARN fagic. Această replicare nu se poate face într-o singură etapă şi întotdeauna intervine o catenă complimentară,conform schemei:



Catena ⊖ este complimentară. Acest fapt este valabil atît pentru ADN cît şi pentru ARN. De exemplu bacteriofagul X174 are ADN monocatenar iar replicarea sa constă în sinteza unei catene complimentare ⊖ care se împerechează într-un dublu helix cu catena ⊕. Acest ansamblu bicatenar poartă numele de formă replicativă (FR). Catena ⊖ a FR serveşte apoi ca matriţă pentru sinteza catenei de ADN ⊕.

Schematic replicarea ARN se realizează conform schemei din fig.95.

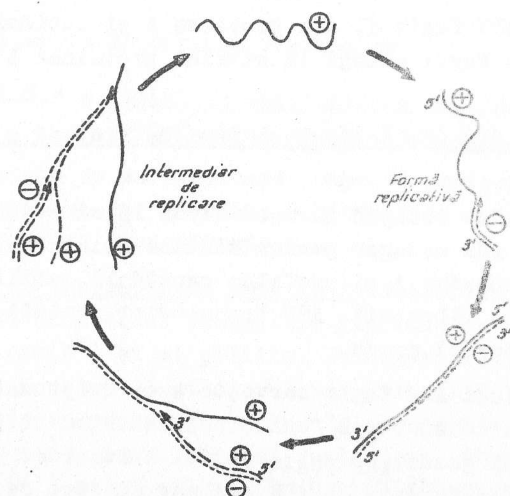


Fig.nr.95.Sinteza catenelor complimentare şi formarea intermediarului de replicare.

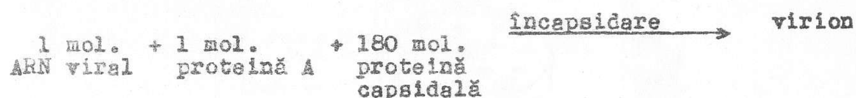
Intr-un prim timp, ARN viral ⊕ serveşte ca matriţă pentru sinteza unei catene ⊖ cu care se împerechează constituind forma replicativă (FR).

In al doilea timp catena ⊖ a FR serveşte ca matriţă pentru sinteza unei catene ⊕ . Aceasta se desprinde şi devine ea însăşi catenă ⊕ parentală, iar în urma ei se pot sintetiza mai multe astfel de catene ⊕ . Ansamblul format de o catenă ⊖ şi mai multe noi catene ⊕ constituie intermediarul de replicare (IR). Ciclul se repetă.

Acest model de replicare, în esenţă semiconservativ, este asimetric deoarece se sintetizează de circa 20 ori mai multe catene ⊕ decît catena ⊖ . Toate reacţiile sînt catalizate de aceiaşi enzimă, ⊖ replicaza virală.

4-5.<u>Faza de asamblare a virionilor şi faza de eliberare.</u>

Mecanismul asamblării şi maturării virionilor cu ARN este puţin cunoscut. Aceasta se realizează probabil după schema:



După 60 minute de la debutul infecţiei bacteria infectată lizează eliminînd pînă la 40.000 de virioni sau particule fagice infectante.

11.6.4. <u>Bacteriofagii temperaţi şi lizogenia</u>

Studiul comportamentului speciei <u>Escherichia coli</u> tulpina K_{12} a evidenţiat un alt aspect al infecţiei celulei bacteriene cu un bacteriofag.

Dacă o cultură de E.coli K_{12} este supusă unei iradieri cu UV, se constată, după o perioadă de timp corespunzătoare unei generaţii bacteriene, liza tuturor celulelor, (Fig.nr.96) şi eliberarea unui fag denumit fagul λ , morfologic şi structural asemănător fagilor din seria T. Această experienţă demonstrează că toate celulele de E coli K_{12} sînt infectate cu fagul λ ,dar că acesta nu este virulent deoarece nu intră în fază vegetativă. Un astfel de fag este numit "temperat" iar bacteria care poartă fagul temperat este lizo-

genă deoarece poate, sub acțiunea unui stimul fizic(raze X sau UV) sau chimic (azot iperită, etilenimină, etc.), prin inducție, să lizeze și să elibereze virionii. In acest caz fagul temperat trece din faza latentă în faza vegetativă, analoagă celui a fagului T_2. Din acest motiv celulele de E.coli K_{12} se mai notează și E.coli $K_{12}(\lambda)$.

Bacteriile lizogene prezintă două caractere esențiale:

-găzduiesc un element specific, diferit de bacteriofagul liber care poartă numele de profag și care se poate transforma în fag vegetativ fie spontan fie prin inducție declanșînd ciclul litic;

-sînt imune față de fagul respectiv. Intr-o populație de E.coli $K_{12}(\lambda)$, prin liza spontană a unor celule se pot elibera fagi λ dar aceștia nu pot infecta celulele supraviețuitoare deoarece acestea sînt imune față de fagul λ.

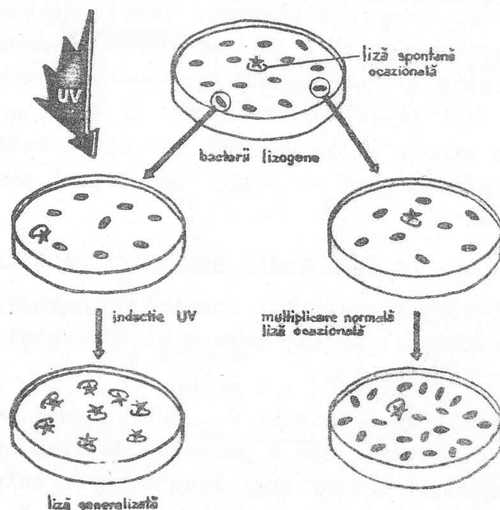


Fig.nr.96.Eliberarea bacteriofagului după iradierea cu UV.

Genomul fagului λ este reprezentat de o moleculă bicatenară, dar liniară, de ADN, lungă de circa 15 mμ . Extremitățile moleculei de ADN sînt monocatenare și complimentare ceea ce permite împerecherea bazelor și circularizarea

moleculei. Fagul λ își injectează ADN său linear în celula bacteriană dar după penetrație ADN se circularizează. In continuare există două posibilități:

-ADN fagic intră în fază vegetativă și determină ciclul litic, deja descris,sau

-molecula circulară de ADN fagic se integrează în cromozomul bacterian și determină ciclul lizogen. Genomul fagic astfel integrat poartă numele de profag.

Profagul se integrează în cromozomul bacterian într-un loc bine definit, locusul "att" situat între gena "gal" și gena "bio" Integrarea necesită prezența unei enzime - integraza - codificată de gena "int" care catalizează un crossing-over între ADN fagic și cel bacterian la nivelul situsului "att".

Profagul integrat în cromozomul bacterian reprezintă genomul bacteriofagului (fig.nr.97) dar nu este infecțios deoarece nu se replică autonom.

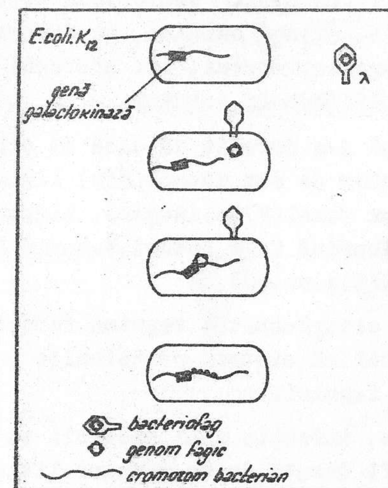


Fig.nr.97.Localizarea profagului în cromozomul bacterian

Intre celula bacteriană lizogenă și profagul său se stabilește o relație de echilibru. Bacteria lizogenă este

imună la o nouă infecție cu același fag dar poate fi infectată de alți bacteriofagi.

In bacteria lizogenă profagul se comportă ca o genă care se replică sincron cu ADN bacterian și este transmisă la descendenți în urma diviziunilor succesive ale celulei.

Existența bacteriofagilor temperați ridică problema d' ce un bacteriofag este virulent pentru unele celule bacteriene, lizîndu-le, în timp ce în altele el se transformă în profag, pierzîndu-și funcțiile esențiale. Acest comportament diferit al unui bacteriofag se explică prin absența sau prezența în celulele bacteriene a unei proteine speciale, cu rol de represor citoplasmatic. Dacă o celulă bacteriană sintetizează acest represor fagul infectant nu poate intra în ciclul vegetativ și devine profag, integrîndu-se în cromozomul bacterian. Cînd celula bacteriană infectată nu sintetizează represorul, fagul intră imediat în faza vegetativă și în cele din urmă bacteria lizează. Liza celulelor bacteriene lizogene sub acțiunea inductorilor, U.V. agenți chimici, se datorește faptului că inductorul distruge represorul, iar profagul se transformă în fag vegetativ replicîndu-se autonom.

Experimental s-a dovedit că dacă se conjugă o celulă bacteriană, cu caracter de sex mascul(Hfr) lizogenă cu o celulă cu caracter de sex femel(F)nelizogenă, zigotul(merozigotul) rezultat lizează eliberînd fagi activi.Fenomenul poartă numele de inducție zigotică(fig.nr.98).

Represorul citoplasmatic reprimă funcțiile genelor structurale care codifică sinteza proteinelor precoce absolut necesare replicării fagului.

Prin urmare, infecția unei bacterii cu un bacteriofag temperat poate fi urmată de un răspuns litic sau de unul lizogen.(Fig.nr.99). Este, într-un anumit fel, o competiție între sinteza proteinelor precoce și sinteza represorului. In primul caz răspunsul litic se manifestă datorită sintezei proteinelor precoce înaintea represorului genomul fagului rămînînd autonom, în al doilea caz se sintetizează mai întîi represorul iar materialul genetic fagic se integrează în cro-

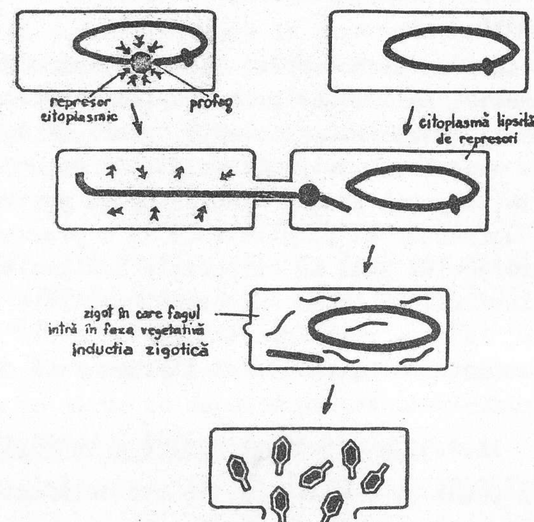


Fig.nr.98.Inducția zigotică.

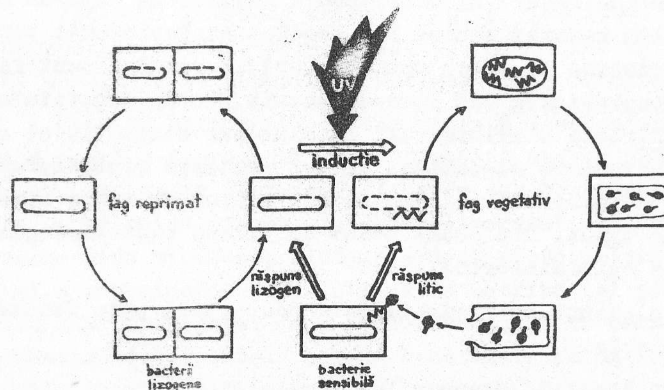


Fig.99.Răspunsul litic și răspunsul lizogen.

mozomul bacterian în stare de profag. Acest comportament al genomului bacteriofagului temperat sugerează pe cel al unui epizom care poate exista alternativ în stare autonomă sau în stare integrată.

Dobîndirea caracterului lizogen pentru un fag dat, de către o bacterie, se traduce prin apariția unor caractere noi și neașteptate. Acest fenomen poartă numele de conversie lizogenică. Spre exemplu, o tulpină netoxigenă de Corynebacterium diphteriae în momentul cînd devine lizogenă pentru fagul temperat β , dobîndește și proprietatea de a produce toxina. Pierderea profagului duce la dispariția toxigenității. Astfel de exemplu întîlnim și la streptococul hemolitic dar mai ales la salmonele, la care structura antigenică poate fi modificată funcție de dobîndirea caracterului lizogen față de fagul temperat ε .

11.6.5. <u>Importanța practică a bacteriofagilor</u>

Din punct de vedere practic bacteriofagii prezintă importanță în:

a)Tipizarea și identificarea bacteriilor, datorită marei specificități a bacteriofagilor pentru o specie sau tulpină bacteriană.

b)Indicatori ai unor specii bacteriene într-un mediu dat. Datorită parazitismului lor absolut bacteriofagii vor însoți întotdeauna și peste tot, bacteriile gazdă. Identificarea unui bacteriofag dat într-un anumit biotop constituie o dovadă indirectă a existenței, în biotopul respectiv și a speciei bacteriene receptive. Astfel prezența bacteriofagului Vi în apa de conductă sau apa de rîu indică prezența speciei Salmonella typhi. Din acest punct de vedere bacteriofagii au importanță epidemiologică.

c)Agenți de variabilitate bacteriană prin fenomenul de transducție.

11.7. <u>Virusurile animalelor</u>

Principalele grupe de virusuri ale animalelor sînt cuprinse în tabelul nr.29. Aceste grupe au fost definite pe

baza structurii virionilor iar în unele cazuri au fost luate în considerație și caracterele ecologice.

11.7.1. <u>Ciclul de multiplicare</u>

Ciclul de multiplicare la virusurile animalelor cuprinde în esență aceleași faze ca și în cazul bacteriofagilor, dar cu unele particularități. Pe de altă parte, evenimentele care se succed de-a lungul etapelor ciclului diferă profund după cum virusurile conțin ARN sau ADN.

11.7.1.1. <u>Multiplicarea la virusurile cu ARN</u>.

Cu excepția reovirusurilor, la toate celelalte grupe ARN este monocatenar. Unele din ele au virionii cu simetrie icozaedrică, la altele simetria virionilor este helicală.

Pentru urmărirea fazelor ciclului de multiplicare ne vom referi la un virus cu capsidă cubică-icozaedrică (Poliovirus) și la altul cu capsidă helicală.

a)<u>Multiplicarea virusului poliomielitei (Poliovirus)</u>

Virionii poliovirusului se adsorb la suprafața celulelor receptive datorită unei complementarități specifice dintre proteinele capsidale și receptorii lipoproteici din membrana celulară. Acești receptori sînt întîlniți numai la celulele umane și a unor specii de maimuțe.

Virionul pătrunde în celulă prin pinocitoză după care este decapsidat intracitoplasmatic, eliberînd ARN infecțios. Faza de adsorbție și penetrație durează circa 30 minute.

Faza de eclipsă și cea de sinteză a constituienților virali durează 2-3 ore. ARN poliovirusului analog ARN fagului MS_2 va avea succesiv două funcții: a)de ARN mesager pentru sinteza proteinelor precoce, a ARN polimerazei, a unei proteine represoare care blochează sinteza ARN și proteinelor celulei gazdă și a proteinelor capsidale; b)de matriță $\oplus$ pe care, datorită ARN polimerazei deja sintetizată, se va forma catena complimentară $\ominus$. Ambele catene constituie forma replicativă (FR). Plecînd de la catena $\ominus$ se sintetizează succesiv copii ale catenei $\oplus$, ansamblul lor reprezentînd intermediarul de replicare (IR). Numai catenele de ARN $\oplus$ sînt infec-

ţioase şi se încapsidează în fazele următoare.

Mecanismul încapsidării şi asamblării virionilor nu se cunoaşte. Virionii maturi se acumulează în citoplasmă după circa 3 ore de la debutul infecţiei. Eliberarea lor se face prin liza celulei.

b)Multiplicarea virusului gripal(Myxovirus)

Virusul gripal are o structură caracteristică(fig.85). Conţine ARN (0,8% ceea ce corespunde la circa 6000 nucleotide), înconjurat de o capsidă cu simetrie helicală. Intreaga nucleocapsidă este înfăşurată într-un peplos de natură lipoproteică şi mucopolizaharidică. Constituienţii virali sînt dotaţi cu proprietăţi antigenice, Virionii conţin două feluri de antigeni: un antigen profund, corespunzător nucleocapsidei şi un antigen superficial, legat de peplos.

Se cunosc trei tipuri independente de virusuri gripale: A,B şi C, iar fiecare tip are numeroase tulpini. Tipurile se deosebesc între ele prin antigenul profund, stabil, iar tulpinele diferă numai prin antigenul superficial, labil. Practic o tulpină a unui tip de virus gripal este incriminată în producerea unei epidemii. Această tulpină însă este supusă variabilităţii. Este posibil să apară o nouă tulpină numai datorită înlocuirii, în proteinele spiculelor peplosului, a unui singur acid aminic prin altul. Noua tulpină diferă de precedenta numai prin antigenul periferic. Tulpina veche, după un anumit timp, dispare din natură(se poate păstra doar în laboratoare) şi locul ei va fi luat de noua tulpină care va produce o nouă epidemie, dat fiind faptul că populaţia devenită imună pentru prima tulpină nu mai este imună şi pentru tulpina nouă, datorită diferenţelor de antigenitate. Această instabilitate antigenică caracteristică virusurilor gripale explică practic lipsa de imunitate în gripă. Ea nu se constată la alte virusuri. De exemplu virusurile oreionului şi rujeolei sînt foarte stabile astfel încît imunitatea produsă de prima infecţie rămîne, de regulă, toată viaţa.

In ciclul său de multiplicare virusul gripal parcurge aceleaşi faze ca şi celelalte virusuri.

Tabel nr.29

Principalele grupe de virusuri care produc infecţii la mamifere.

Grupul	Proprietăţi fizico-chimice	Alte caracteristici	Exemple
1.ADENOVIRUSURI	Capsidă icozaedrică, lipsită de peplos.ADN dublu catenar.	Obişnuit agenţii unor infecţii latente ale ţesutului limfoid.Unele produc tumori.	Membrii grupului sînt desemnaţi cu un număr.
2.VIRUSURI TUMORALE CU ADN.	Capsidă icozaedrică,lipsită de peplos.ADN dublu catenar.	Produc tumori la animale	Polioma, Papiloma, SV-40.
3.HERPESVIRUSURI	Capsidă icozaedrică cu peplos.ADN dublu catenar.	Produc infecţii latente.	Herpes simplex,Varicelă (zona zoster),Pseudorabic.
4.POXVIRUSURI	Capsidă helicală cu peplos ADN dublu catenar.	Virusuri mari paralipipedice sau ovale.Au afinitate pentru celulele epidermice. Unele(virusul mixomului şi cel al fibromului)produc tumori.	Smallpox, Vaccină, Cowpox.
5.PICORNAVIRUSURI	Capsidă icozaedrică lipsită de peplos.ARN monocatenar.	Virusuri mici.Produc infecţii enterice şi/sau respiratorii.	Poliovirus,Virusul Coxackie,Rinovirus, Virusul Echo.
6.REOVIRUSURI	Capsidă icozaedrică lipsită de peplos.ARN dublu catenar	Virusuri mari.Produc infecţii ubicuitare.	Membrii grupului sînt desemnaţi cu un număr.
7.ARBOVIRUSURI	Capsidă icozaedrică(probabil) cu peplos. ARN mono catenar	Transmisibile prin insecte.	Virusul febrei galbene Virusul encefalitei equine, virusul febrei denga, etc.
8.MYXOVIRUSURI	Capsidă helicală cu peplos. ARN mono catenar.	Se multiplică în nucleu.	Virusul gripal.

Grupul	Proprietăţi fizico-chimice	Alte caracteristici	Exemple
9.PARAMYXOVIRUSURI	Capsidă helicală cu peplos.ARN mono catenar.	Se multiplică în citoplasmă. Posedă o hemolizină.	Virusul parainfluenţei Virusul Newcastle,etc.
1o.VIRUSURI TUMORALE CU ARN	Arhitectură necunoscută. Prezintă peplos. ARN mono catenar.	Produc tumori la animale.	Virusurile leucemice murine, Virusurile tumorilor mamare la şoarece, Virusurile leucozice aviare, Virusul sarcomului Rous.

1.Faza de adsorbţie şi penetraţie. Peplosul virionului gripal conţine, printre altele, două componente proteice specifice. Una din ele - hemaglutinina - are mare afinitate pentru mucopolizaharidele de pe suprafaţa celulelor animale. Cea de a doua proteină este o enzimă numită neuraminidaza.

Adsorbţia virionilor gripali pe celulele gazdă(celulele tractusului respirator) este rezultatul interacţiunii dintre hemaglutinină şi receptorii mucopolizaharidici specifici suprafeţei celulare (Fig.nr.100). Această adsorbţie, într-o primă etapă, este reversibilă deoarece este contrabalansată de

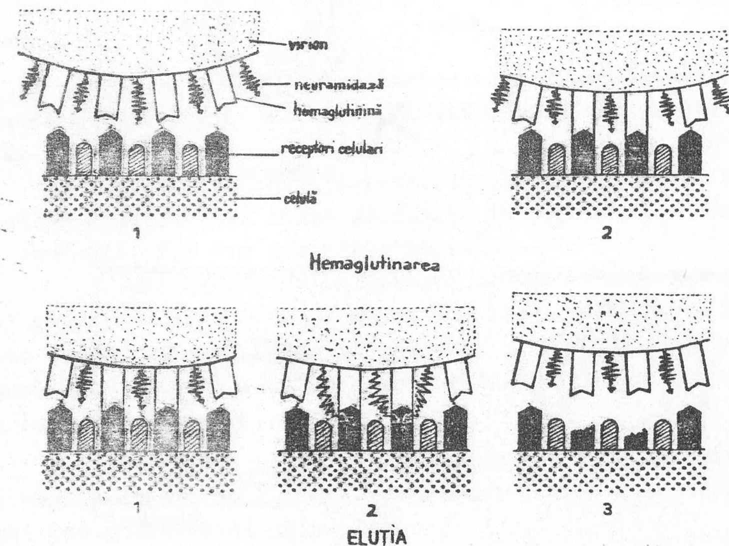


Fig.nr.100.Hemaglutinarea şi eluţia.

acţiunea neuraminidazei care distruge receptorii pe care se fixează hemaglutinina. Acest fenomen poartă numele de eluţie şi el prezintă importanţă doar în cazul celulelor inerte,cum sînt hematiile, deoarece un virion fixat într-un punct se eluiază, apoi se fixează în alt punct ş.a.m.d. ajungînd în final să epuizeze toată suprafaţa hematiei care va deveni astfel neaglutinabilă pentru virionii tulpinei respective. In cazul

infecțiilor naturale sau a culturilor de celule, după adsorbție urmează imediat penetrația, deoarece eluția nu mai are timp să se producă. In acest caz penetrația corespunde fazei de infecție celulară. Intregul virion este încorporat într-o vacuolă intracitoplasmatică printr-un mecanism asemănător fagocitozei. (Fig.nr.101).

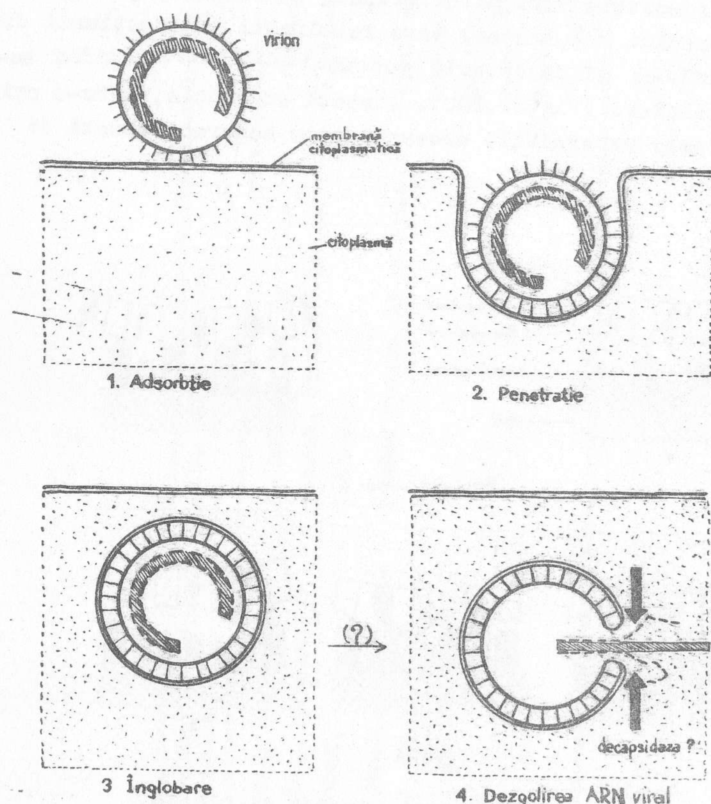


Fig.nr.101.Infecția unei celule cu virionul gripal.

In interiorul citoplasmei peplosul se deschide iar nucleocapsida va fi decapsidată sub acțiunea unei enzime - decapsidaza - pusă în evidență la unele virusuri, eliberînd în citoplasmă ARN infecțios.

2-3.Faza de eclipsă și faza de sinteză a constituienților virali.

După 2-3 ore de la debutul infecției, în citoplasmă pot fi observați primii constituienți ai virionului. Totuși în cazul virusului gripal faza de eclipsă nu a putut fi studiată ca la bacteriofagi și nu s-au putut pune în evidență, decît indirect, existența proteinelor precoce comparabile cu cele de la bacteriofagi. S-a constatat însă că sinteza nucleocapsidei și a peplosului se desfășoară independent în două regiuni diferite ale celulei.

ARN se replică în nucleu iar proteinele capsidale în citoplasmă, trec apoi în nucleu (fig.102-1) de unde,după asamblarea lor într-o nucleocapsidă, migrează progresiv în citoplasmă și ajung la periferia celulei, în apropierea membranei.

Hemaglutinina și neuraminidaza se sintetizează în citoplasmă și apoi se localizează în citoplasma superficială (fig.102-2).

Pentru ceilalți constituienți ai peplosului nu au loc sinteze speciale, ei fiind antrenați în peplos, fie din membrana nucleară, fie din cea citoplasmatică.

Spre deosebire de virusul poliomielitei ARN virusului gripal nu poate funcționa ca ARN mesager. El este transcris în ARN mesager datorită unei ARN polimeraze constitutivă adusă de nucleocapsidă. In rest replicarea ARN este identică ca la fagul MS_2 sau la poliovirus.

4.Faza de asamblare.Asamblarea virionului gripal se realizează în două etape: organizarea nucleocapsidei și apoi încorporarea ei în peplos.

Mecanismul de asamblare a nucleocapsidei virusului gripal nu este încă cunoscut. Se știe doar că asamblarea ei are loc în nucleul celulei gazdă de unde străbătînd membrana nucleară migrează,prin citoplasmă spre periferia celulei unde se acumulează ceilalți constituienți ai virionului sintetizați în citoplasmă.

Membrana citoplasmatică suferă o serie de modificări și va încorpora nucleocapsida virală. Modificările membranei

citoplasmatice constau în încorporarea printre constituienţii ei normali a hemaglutininei şi neuraminidazei, care sînt proteine codificate de ARN viral (fig.102-3).Membrana astfel modificată apoi proeminează formînd un mugure viral, care reprezintă virionul complet constituit (fig.102-4).

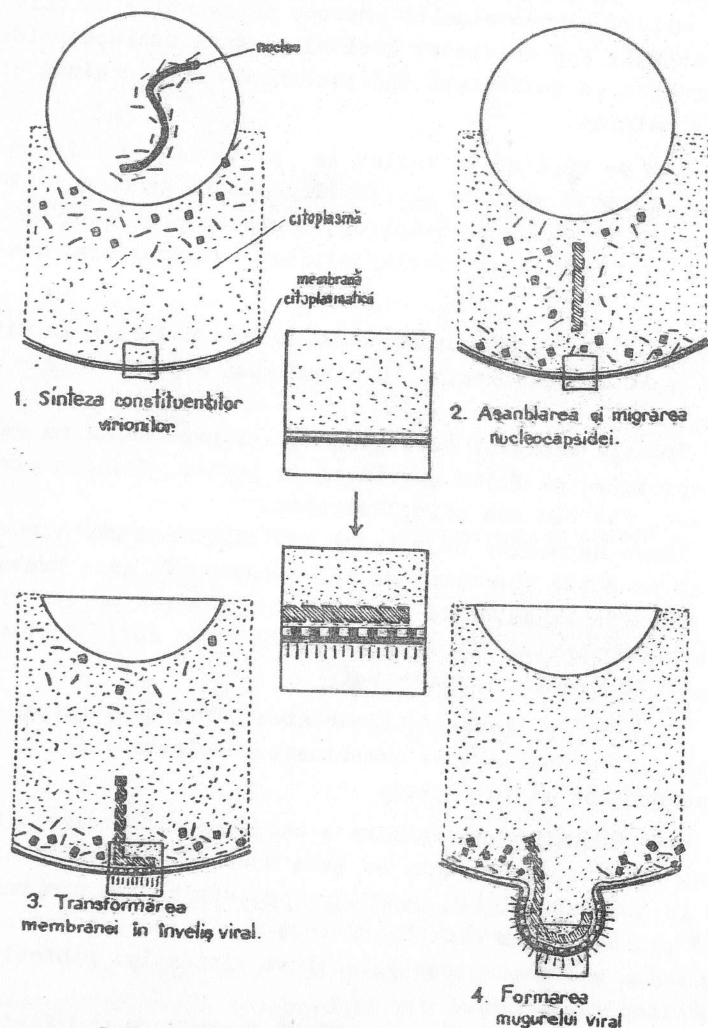


Fig.nr.102.Sinteza şi asamblarea constituienţilor virionului gripal,

5.<u>Faza de eliberare a virionilor</u>. Eliberarea virionilor se realizează prin separarea mugurilor virali de membrana citoplasmatică a celulei gazdă. Virionul odată eliberat rămîne, uneori, adsorbit pe mucopolizaharidele care acoperă suprafaţa celulelor, pînă cînd intervine fenomenul de eluţie produs de neuraminidază. Un astfel de mecanism de eliberare nu necesită o efracţie a membranei citoplasmatice şi nu produce, prin el însuşi, leziuni celulare ireparabile. Este vorba de un proces foarte asemănător cu clasmatoza, fenomen prin care o celulă normală eliberează,din timp în timp, un fragment de citoplasmă. Celula gazdă supravieţuieşte eliberării virionilor dar metabolismul ei este profund perturbat astfel încît în final celula va liza.

Ciclul complet de multiplicare a virusului gripal poate fi urmărit în figura 103.

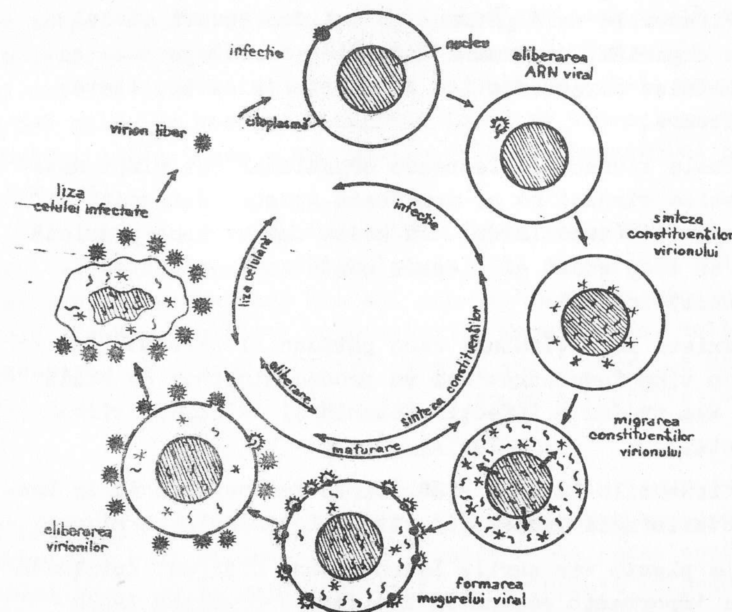


Fig.nr.103.Ciclul ontogenetic la virusul gripal.

11.7.1.2.Multiplicarea virusurilor animale cu ADN.

Virusurile animale cu ADN se multiplică în nucleul celulelor gazdă. Excepţie fac virusurile din grupul Pox.

Adsorbţia se realizează ca şi în cazul virusului gripal, iar penetraţia se face prin pinocitoză. Decapsidarea virionilor începe în momentul străbaterii membranei citoplasmatice şi se desăvîrşeşte prin traversarea membranei nucleare.

In nucleu ADN viral serveşte ca matriţă pentru sinteza unui ARN mesager precoce şi paralel ADN viral se replică.

Proteinele capsidale se sintetizează la nivelul ribozomilor din citoplasmă în urma traducerii ARN-mesager, de unde apoi migrează în nucleu unde are loc asamblarea virionilor.

La sfîrşitul ciclului de multiplicare virionii asamblaţi în nucleu traversează membrana nucleară, ajung în citoplasmă de unde vor fi eliberaţi în urma lizei celulei.

11.7.2.Virusurile latente

Virusurile care pătrund şi îşi desfăşoară ciclul complet în organism, determină infecţii(viroze)aparente,cu simptome clinice caracteristice şi cu starea de imunitate corespunzătoare.

Unele virusuri infectează organismul dar simptomele caracteristice virozei nu se manifestă.Acestea determină viroze inaparente(subclinice). In acest caz virusul persistă în celule un timp scurt şi dispare odată cu apariţia anticorpilor specifici.

Există însă virusuri care pătrund şi persistă în organism un timp îndelungat dar nu produc simptome de boală aparentă. Ele produc o infecţie latentă şi se numesc virusuri latente.

Virusurile latente sînt foarte frecvente atît la bacterii (bacteriofagii temperaţi) cît şi la animale şi plante.

La plante virusurile latente sînt frecvent întîlnite şi au mare importanţă economică deoarece reprezintă rezervoare de infecţie, necunoscute şi nebănuite, pentru alte specii. De exemplu Cuscuta campestris poate fi invadată de

virusuri latente transmisibile la peste 100 de alte specii de plante.

Numeroase virusuri latente se întîlnesc la insecte. Majoritatea virusurilor fitopatogene, transmisibile prin insecte vectoare, rămîn în stare latentă atît timp cît se găsesc în organismul insectei. Exemple: virusul mozaicului cerealelor la Delphax striatella,virusul răsucirii frunzelor de cartof la Mysus persicae, virusul mozaicului tutunului la Peregrinus maitidis, ş.a.

La insecte şi acarieni se întîlnesc în stare latentă şi numeroase virusuri patogene pentru om şi animale(virusul encefalitei equideelor la căpuşe, virusul febrei papataci la flebotomi, etc.).

La animalele superioare virusurile latente sînt de asemenea frecvente. Astfel virusul glandelor submaxilare de la cobai este întîlnit în unele crescătorii la circa 90% dintre cobaii adulţi şi care aparent sînt sănătoşi. Dacă o suspensie preparată din glandele salivare ale unor astfel de cobai este inoculată intracerebral la puii de cobai, aceştia mor în 5-7 zile. In aceeaşi categorie intră şi virusul choriomeningitei infecţioase a şoarecilor, virusul pneumoniei şoarecilor, etc.

La om un exemplu de virus latent este virusul herpesului. Acesta poate rămîne latent luni sau ani de zile pînă cînd sub influenţa unor factori care slăbesc rezistenţa organismului (febră, infecţii respiratorii, menstruaţie, tulburări digestive, iradiere cu UV sau raze X, etc.) provoacă manifestările clinice de boală,leziunea cutanată caracteristică.

11.7.3.Virusurile defective.

Conceptul de virus defectiv a fost introdus de A. Hanafusa, T.Hanafusa şi H.Rubin, în 1963, pentru a desemna un virus care pătrunde într-o celulă gazdă nu-şi poate continua ciclul său pînă la producerea virionilor maturi în prezenţa unui virus auxiliar, asociat,numit virus "helper".

Fenomenul de defectivitate a fost descris la tulpina Bryan a virusului sarcomului lui Rous, virus tumoral la găini.

Acest virus produce convertirea celulelor normale în celule tumorale dar acestea nu conţin virioni. Dacă celulele tumorale sînt suprainfectate cu un virus leucozic aviar (RAV sau Rous associated virus),înrudit antigenic cu virusul sarcomului Rous, se constată apariţia în celulele tumorale atît a virionilor virusului sarcomului Rous cît şi a virionilor virusului leucozic aviar. In acest caz virusul leucozic aviar este "helper", auxiliar.(Fig.nr.104.

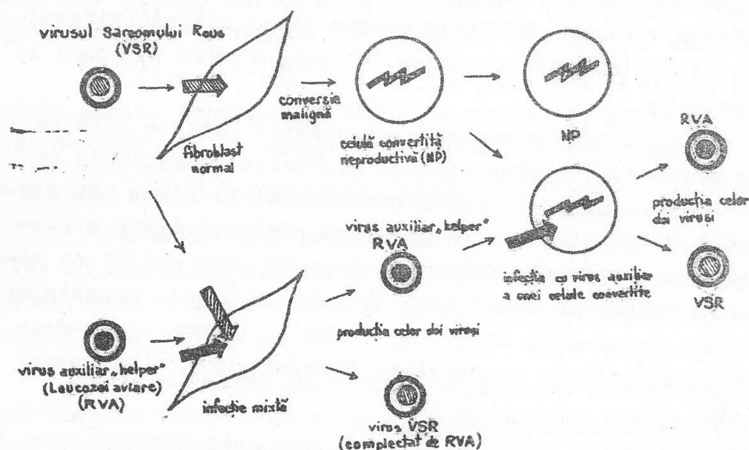


Fig.nr.104.Virusuri defective.

Din această experienţă se poate trage concluzia că în celulele infectate cu virus defectiv, acidul nucleic viral se integrează în genomul celulei gazdă, produce malignizarea celulelor şi paralel se replică, dar este incapabil să inducă sinteza proteinelor capsidale. Virusul "helper" este acela care induce sinteza proteinelor capsidale care vor fi puse la dispoziţia acidului nucleic al virusului sarcomului Rous (VSR) pentru asamblarea virionilor, deoarece capsidele ambilor virusuri au proprietăţi atigenice identice.

Se cunosc astăzi mai multe virusuri defective şi de asemenea numeroase virusuri "helper".

11.7.4.Virusurile tumorale(oncogene).

O caracteristică a ţesuturilor animale este creşterea limitată, autoreglată, a celulelor sale componente. In cazuri excepţionale însă o celulă poate scăpa de sub controlul proceselor reglatoare normale şi se divide nelimitat, anarhic, formînd o masă celulară anormală,sau tumoră. Procesul de formare al tumorilor se numeşte neoplazie.

Unele tumori (fibromul, lipomul, papilomul) sînt benigne,adică rămîn localizate, nu alterează structura şi funcţiile ţesutului şi organismului în care apar. Alte tumori sînt maligne sau canceroase. Acestea au o creştere invazivă, organul sau ţesutul în care apar este distrus iar în final organismul moare. Unele celule din tumorile maligne se pot desprinde şi migrează (pe cale sangvină) la mari distanţă, localizîndu-se în alte ţesuturi şi organe unde formează tumori secundare sau metastaze.

In general tumorile se desemnează prin numele ţesutului în care se formează la care se adaugă subfixul - oma, iar în vorbirea curentă, subfixul - omul. De exemplu limfoma (limfomul) este cancerul ţesutului limfoid, sarcoma(sarcomul) cancerul ţesutului conjunctiv neepitelial, adenocarcinoma (adenocarninomul) cancerul ţesutului glandular,ş.a.m.d.

Etiologia tumorilor canceroase este foarte mult discutată şi cercetată. Au existat mai multe teorii(anaplazică, chimică, genetică, hormonală), dar în ultima vreme tot mai mult este discutată şi acceptată teoria virală a etiologiei cancerului.

Pentru prima dată relaţia dintre virusuri şi cancer a fost evidenţiată de V.Ellerman şi O.Bang în 1908,constatînd că unele leucemii la găină puteau fi transmise, la păsări sănătoase, prin filtrate acelulare de sînge de la găinile bolnave.

In 1911, Peyton Rous descoperă că sarcomul muşchiului pectoral de la găină este produs de un virus oncogen,cunoscut de atunci sub denumirea de virusul sarcomului Rous(VSR).

Alte virusuri oncogene au fost descoperite după 20 ani, Astfel în 1932 şi 1933 R.E.Shope descoperă virusurile

fibromului şi papilomului la iepure, iar în 1936 J.J.Bittner dovedeşte că tumorile mamare la şoarece sînt produse de un virus care se poate transmite,de la mamă la pui,prin lapte.

In 1951 Gross descoperă etiologia virală a leucemiilor la şoareci iar Stewart şi Eddy în 1953 confirmă descoperirea.

Mai recent, Jarett descoperă virusul leucemiei la pisci şi virusul leucemiei bovinelor, boală cunoscută ca epizotie în ţările scandinave, Germania şi SUA.

Perfecţionarea tehnicilor de cercetare a dus la descoperirea unui număr mare de virusuri oncogene iar altele sînt suspectate de a fi oncogene.

Tumorile canceroase pot fi provocate(induse) atît de virusurile cu ADN cît şi de cele cu ARN.

Oncovirusurile cu ADN sînt caracterizate prin capacitatea lor de a transforma în celule canceroase numai celulele nepermisive, respectiv numai celulele care nu permit replicarea virală sau celulele în care ADN viral rămîne defectiv. Celulele permisive, adică celulele în care aceste virusuri se replică, nu se malignizează ci vor fi distruse.

Oncovirusurile cu ARN se replică în celulele în care pătrund fără a le distruge, malignizînd atît celulele permisive cît şi pe cele nepermisive.Aceste virusuri produc leucemii, sarcoame şi tumori mamare. Virionii lor au diametrul de 1000 Å, prezintă peplos, şi au mare afinitate pentru organele bogate în sistem reticuloendotelial.

Teoria etiologiei virale a cancerului se sprijină pe o serie de dovezi care pot fi grupate astfel:

1.Dovezi clinice şi epidemiologice

a)Existenţa unor leucemii cu caracter epidemic.

b)Frecvenţa relativă a leucemiilor la copii mici şi sensibilitatea mai mare a animalelor nou născute la virusurile leucomogene.

c)Descoperirea, în 1960, de către Burkitt, în Uganda, a unei tumori maxilare la copii, cu o structură celulară

foarte apropiată de a tumorilor limfoide din leucemii. Această tumoră are un caracter oarecum epidemic, este dependentă de temperatura şi umiditatea mediului înconjurător şi are,în general,aceeaşi arie geografică ca şi a ţînţarului anofel încriminat ca vector,pentru virusul oncogen respectiv.

2.Dovezi microscopice şi citologice.

a)Evidenţierea la microscopul electronic, în secţiuni ultra fine prin biopsiile de ţesut tumoral sau în sîngele leucemicilor a unor particule cu aspect viral.

b)Identificarea a două tipuri de virusuri în culturile de celule din tumora Burkitt. Unul asemănător virusurilor leucomogene animale, altul asemănător virusului herpetic.

c)Virusul herpetic ca şi virusul zona-zoster sau cel al varicelei sînt frecvent asociate virusurilor leucemiilor. In celulele unei tumori maligne a gîtului la om, în extremul orient, Epstein şi Barr au pus în evidenţă prezenţa virusului herpesului. Aceste cercetări sugerează intervenţia, cel puţin în geneza leucemiilor animale şi umane, a două tipuri de virusuri: oncovirusul cu ARN şi a unui virus din grupul herpes. Primul ar fi oncogen numai după ce este activat de al doilea.

3.Dovezi experimentale

a)Inducerea, la animale, de tumori si în special leucemii prin inocularea unor filtrate acelulare obţinute din ţesuturi leucemice umane.

b)Producerea de tumori maligne la animale prin inocularea acizilor nucleici extraşi din ţesuturile leucemice umane.

c)Reproducerea acţiunii citopatogene, pe culturi de celule embrionare de om, a virusurilor izolate din măduva osoasă de la omul leucemic.

d)Reproducerea pe culturi de celule a unor tumori maligne musculare şi osoase.

Dovezile de mai sus fac incontestabilă originea virală a cancerului la animale. In ce priveşte cancerul uman, rezultatele cercetărilor nu sînt întotdeauna concludente.

Obiecţia principală care se aduce originii virale a cancerului uman este că nu în toate tumorile maligne umane

s-a putut pune în evidenţă prezenţa unui virus oncogen, sau că virusurile izolate din aceste tumori nu reproduc, cu regularitate, tumora la animale.

Se pare însă că nu este obligatoriu ca virusul oncogen să fie evidenţiat în celulele malignizate, deoarece el poate maligniza celulele normale prin integrarea sa în genomul acestora. Faptul că nu toate tumorile maligne umane pot fi reproduse pe animale, prin inocularea filtratelor acelulare, s-ar putea explica tocmai prin integrarea acidului nucleic viral în genomul celulei. Pe de altă parte, nu toate virusurile oncogene pot depăşi limitele de specie.

Elemente noi şi de o deosebită importanţă au fost aduse de cercetările întreprinse în ultimul deceniu. Astfel, <u>Renato Dulbeco</u> dovedeşte că ADN virusului SV-40(oncogen)în celulele nepermisive se integrează în ADN cromozomal malignizînd celulele. ADN viral determină în acest caz o stimulare a replicării ADN cromozomal şi represează genele care guvernează sinteza proteinelor capsidale. Malignizarea este astfel produsă de multiplicarea anarhică a ADN cromozomal, stimulată de ADN viral integrat. Fenomenul este însoţit şi de dispariţia inhibiţiei de contact în sensul că suprafaţa celulei suferă o alternare care îi permite multiplicarea anarhică şi constituirea tumorilor.

<u>Howard Temin</u> (1964) experimentînd cu VSR demonstrează că, spre deosebire de virusurile cu ARN-neoncogene, replicarea VSR reclamă mai întîi sinteza unui ADN şi ulterior pe acesta se sintetizează ARN viral. El emite ipoteza că informaţia genetică se transmite, în acest caz, de la ARN la ADN şi apoi din nou la ARN şi că numai acest comportament paradoxal ar putea explica integrarea genomului virusurilor oncogene cu ARN în genomul celulei gazdă.

Ipoteza lui <u>Temin</u> contrazicea dogma centrală după care informaţia genetică se transmite numai de la ADN la ARN şi niciodată invers. Totuşi ipoteza lui <u>Temin</u> este strălucit confirmată în 1970 de însăşi autorul ei şi independent de <u>Baltimore</u>.

<u>Temin</u> şi <u>Mizutani</u> şi simultan <u>Baltimore</u> descoperă, în VSR şi în virusul leucemiei şoarecilor, o enzimă capabilă să sintetizeze un ADN complimentar ARN viral. Această ADN-polimerază-ARN-dependentă numită <u>transcriptază inversă</u> a fost ulterior identificată la toate virusurile oncogene cu ARN.

Dacă <u>R.Dulbeco</u> demonstrase că oncovirusurile cu ADN se pot integra în genomul celular, <u>Temin</u> şi <u>Boltimore</u> explică în mod corect integrarea virusurilor oncogene cu ARN în genomul celulelor care se malignizează. In felul acesta teoria etiologiei virale a cancerului primeşte o nouă confirmare şi explică de ce virusul oncogen nu poate fi pus în evidenţă întotdeauna în celulele tumorale.

Descoperirea transcriptazei inverse prezintă o importanţă teoretică şi practică covîrşitoare. S-a şi lansat ideia că oncovirusurile cu ARN pot transfera şi integra informaţii genetice dintr-o celulă în alta. Unele oncovirusuri cu ARN pot să persiste în toate celulele organismului şi pot fi transmise ereditar la generaţiile următoare, potenţa lor oncogenă manifestîndu-se funcţie de un factor biologic, fizic sau chimic, adjuvant. Pe de altă parte, în ultimii ani, s-au identificat unele substanţe chimice care distrug sau inactivează transcriptaza inversă. Distrugerea agentului de integrare a acidului nucleic viral în genomul celulei normale va împiedica malignizarea ei. De aici s-a întrezărit şi descoperirea unor noi agenţi terapeutici eficienţi împotriva cancerului.

11.8.<u>Virusurile plantelor</u>

Se cunosc un număr mare de virusuri ale plantelor dar cel mai bine studiat din toate punctele de vedere este virusul mozaicului tutunului (VMT).

Virionul VMT, are forma unui cilindru gol, lung de 3000 Å şi cu diametrul transversal de 170 Å la exterior şi 40 Å la interior. Capsida este constituită din 2130 capsomere identice. Capsomerele au formă elipsoidală cu lungimea de 70 Å şi grosimea de 23 Å. Sînt constituite dintr-un singur lanţ polipeptidic cu gr.m. de 18.000 cuprinzînd 158 acizi

aminici cu o secvenţionalizare strict definită şi bine cunoscută. Capsomerele sînt astfel asamblate încît formează o spirală fiecare tur de spirală fiind alcătuit din 16 capsomere şi 1/3, respectiv trei ture de spiră sînt formate din 49 capsomere.

Genomul virionului este reprezentat de o moleculă de ARN monocatenar, cu gr.mol.de 3×10^6 daltoni, formată din 6400 nucleotide.ARN este înrulat helicoidal şi inclus în capsomere astfel încît fiecare tur de spiră conţine 49 nucleotide ceea ce înseamnă că fiecărei capsomere îi corespunde trei nucleotide. Aceasta înseamnă că lungimea virionului este strict determinată de ARN viral.

11.8.1.Replicarea virusului mozaicului tutunului

In general fazele multiplicării sînt aceleaşi ca la toate virusurile dar cu unele particularităţi.

Virusurile plantelor, deci şi VMT, nu au specificitate de fixare, deoarece nu pot adera de peretele celulozic al celulelor vegetale şi nu îl pot străbate decît dacă aceste celule prezintă leziuni mecanice sau sînt introduse prin înţepături de insecte.

Pătruns într-o celulă gazdă pe o astfel de cale,virionul VMT ajunge probabil în nucleul celulei unde se decapsidează şi pune în libertate ARN sub forma unei molecule monocatenare. ARN se replică în nucleu şi trece apoi în citoplasmă. Sinteza proteinei capsidale se face în citoplasmă. Moleculele proteice elipsoidale tind să se alipească una de alta. In prezenţa ARN are loc asamblarea virionilor V.MT.

Asamblarea capsomerelor se face automat şi în vitro ceea ce înseamnă că formarea virionilor este determinată de forma şi afinităţile de grupare ale proteinelor capsidale. Astfel morfogeneza capsidei virionului VMT este rezultatul unui proces de adiţie a unor subunităţi (capsomere)identice şi dispuse în poziţii identice. Există, de altfel, virioni ai VMT exclusiv proteici, deci fără ARN dar care nu sînt infecţioşi iar lungimea lor poate fi variabilă.Numai ARN asigură infecţiozitatea, capacitatea de replicare şi determină mărimea virionului VMT.

11.9.Natura virusurilor

Natura virusurilor este una dintre cele mai controversate probleme ale biologiei moderne. Răspunsul la întrebarea dacă virusurile sînt sau nu sînt organisme vii este foarte greu de dat, în primul rînd pentru motivul că, pînă în prezent, nu există o definiţie a vieţii, a ceea ce este viu,unanim admisă. In aceste condiţii este firesc ca asupra naturii virusurilor să existe puncte de vedere diferite, funcţie de poziţia de pe care este abordată problema. Dacă problema este privită numai din punct de vedere genetic, virusurile fiind capabile să se autoreproducă şi să controleze sinteza constituienţilor propriului virion, iar autoreplicare fiind o proprietate a organismelor vii, de sigur că virusurile pot fi considerate organisme vii. Acest punct de vedere este adoptat de Salvador Luria, care consideră caracter esenţial al viului, capacitatea unui material de a reţine, după izolarea sa, o configuraţie specifică şi prin aceasta capacitatea de a fi reintegrat în circuitul materiei vii.Pentru Luria viaţa se identifică cu capacitatea de autoreplicare.

Pe de altă parte, dacă problema este privită mai complex, din punct de vedere al metabolismului şi al căilor de multiplicare a virusurilor, atunci optica se schimbă. Virusurile nu se multiplică independent şi sînt replicate de celula gazdă parazitată.Sinteza constituienţilor virali este realizată de sintemele enzimatice şi organitele(ribozomii) celulei gazdă, pe baza moleculelor organice (acizii aminici,nucleotidele) citoplasmatice şi cu intervenţia compuşilor macroergici celulari. Din acest punct de vedere virusurile nu pot fi considerate organisme vii.

Diferenţele dintre virusuri şi cele mai inferioare organisme vii, bacteriile, sînt numeroase şi fundamentale. (Tabel nr.30).

Aceste diferenţe fundamentale au făcut pe unii autori, printre care A.Lwoff, J.Brachet, Fr.Jacob şi J.Monod să susţină că virusurile nu sînt organisme vii, deoarece organismele vii sînt unităţi independente de structură şi funcţii,

Tabel nr.3o

Diferentele dintre virusuri şi bacterii.

Caracterul		Virus	Bacterie
Tipul de organizare		Acelular	Celular
Unitatea de structură şi funcţie		Virionul	Celula
Dimensiuni		Submicroscopice	Microscopice
Stări posibile de existenţă		Virion Virus vegetativ Provirus	Celulă bacteriană Spor bacterian
Structură internă		Nucleocapsidă Eventual peplos	Relativ complexă: perete celular, structuri membranale, citoplasmă, material nuclear, organite, incluziuni, structuri extraparietale.
Simetrie la nivel molecular		Constantă. Icozaedrică, helicală sau binară	Absentă
Compoziţie chimică.	Acizi nucleici	ADN sau ARN niciodată ambii	ADN şi ARN
	Proteine	Număr fix(1-5) dispuse simetric în capsidă.	Număr variabil, 2-3 mii tipuri diferite cu rol structural şi enzimatic
	Glucide	Absente sau prezente rareori	Constant prezente
	Lipide	Absente sau prezente rareori.	Constant prezente
	Echipament enzimatic	Absent	Constant prezent
Proprietăţi "biologice"	Producerea compuşilor macroergici (ATP)	Absentă	Prezentă
	Sinteza independentă a constituienţilor.	Absentă	Prezentă
	Capacitatea de creştere	Absentă	Prezentă
	Capacitatea de diviziune	Absentă	Prezentă
	Mod de reproducere	Obligator în celula gazdă vie, pornind exclusiv de la genomul viral (replicare)	Multiplicare independentă, pornind de la ansamblul integral al constituienţilor celulei.
	Parazitism absolut	Constant; obligat	Absent

interdependente şi integrate. Aceste unităţi, în esenţă, sînt alcătuite din compuşi macromoleculari, dintre care unii (acizii nucleici şi proteinele) au structură şi funcţii specifice. Pentru perpetuarea vieţii, aceste molecule acţionează cooperat, ca un sistem specific complex şi organizat, capabil să se reproducă independent. Astfel structurile şi funcţiile sînt aspecte complimentare ale vieţii, dar cea mai mică unitate de integrare, cooperare şi reproducere a unui asamblu de constituienţi este celula, sistem biologic dotat cu continuitate genetică. In acest context J.Brachet afirmă că celula reprezintă unitatea fundamentală care stă la baza organizării tuturor organismelor vii. Ori, virusurile au un nivel de organizare subcelular, sînt dependente în mod absolut de celula gazdă şi deci pare justificată opinia lui Watson, după care virusurile nu sînt cu mult mai vii decît cromozomii izolaţi.

După J.Monod, sistemele biologice sînt singurele sisteme din univers dotate cu patru proprietăţi definitorii esenţiale:

a) morfogeneză autonomă;

b) teleonomia sau proprietatea de a avea o structură şi o organizare adaptate pentru asigurarea supravieţuirii individului, dar mai ales a speciei;

c) emergenţa, respectiv proprietatea de a reproduce şi multiplica structuri ordonate cu grad înalt de complexitate şi de a permite crearea evolutivă a unor structuri cu complexitate crescîndă;

d) reproducerea invariantă, adică tendinţa de a reproduce şi transmite informaţia genetică ereditar, de la o generaţie la alta, nemodificată, cu excepţia variaţiilor accidentale (mutagenă, recombinare).

Virusurile nu întrunesc acest complex de proprietăţi care ar putea asigura încadrarea lor în lumea vie.

Fr.Jacob consideră că bacteriile constituie un minim vital. Ele se situiază pe primul nivel de integrare care caracterizează un organism. Celula bacteriană, după Fr.Jacob, este la frontierele lumii vii, la limita cu neanimatul. Nivelul inferior (virusurile) se defineşte în termeni de chimie şi fizică, iar nivelul superior în termeni de organizare, sistem, etc.

O sinteză a ambelor puncte de vedere nu se poate face deoarece amîndouă sînt parţial juste dar nici unul complet satisfăcător. De aceea, probabil, A.Lwoff afirma nu de mult, că discutarea aparenţei virusurilor la lumea vie sau neanimată ar putea fi continuată dar numai ca un excelent exerciţiu intelectual indefinit. Lwoff lansează şi aforismul "Viruses must be considered as viruses because viruses are viruses"+).

Problema naturii virusurilor este deosebit de complexă şi trebuie avut în vedere faptul că virusul trece alternativ prin două stadii: stadiul de virion, liber, infecţios şi stadiul neinfecţios, de replicare intracelulară a materialului său genetic. Nici unul din aceste două stadii, considerate separat, nu exprimă sau nu definesc în totalitate conceptul de virus ci numai atunci cînd sînt luate ambele în consideraţie.Din aceste motive,cel puţin în stadiul actual al cunoştinţelor noastre, este corect să considerăm virusurile ca un grup de entităţi infecţioase,parazite intracelular, capabile de reproducere numai sub controlul propriului lor genom, dar folosind aparatul de sinteză al celulei infectate. Virusurile ar fi deci un grup de entităţi care nu au echivalent nici în lumea organismelor, nici în lumea neanimată.